

RECHERCHES BIOLOGIQUES

SUR QUELQUES

CHAMPIGNONS PARASITES

DE L'HOMME ET DES ANIMAUX

(DIASTASES & TOXINES)

PAR

L. GAUTIER

DOCTEUR ÈS-SCIENCES

PRÉPARATEUR AU LYCÉE DE BREST

BREST

IMPRIMERIE P. GADREAU, RUE MONGE

1907

A M. E. BODIN

PROFESSEUR A L'ÉCOLE DE MÉDECINE DE RENNES

A M. Gaston BONNIER

MEMBRE DE L'INSTITUT

PROFESSEUR A LA SORBONNE

Hommage de respectueuse reconnaissance

RECHERCHES BIOLOGIQUES

SUR QUELQUES

CHAMPIGNONS PARASITES DE L'HOMME ET DES ANIMAUX

Par L. GAUTIER

INTRODUCTION

PLAN ET DIVISION DU SUJET

Les études biologiques, parfois un peu délaissées, sont cependant de celles qui méritent le plus de retenir l'attention ; car, souvent, elles sont appelées à donner la solution de problèmes complexes et d'un profond intérêt.

La biologie végétale en particulier nous offre une riche source de matériaux encore peu exploités et propres à susciter des recherches fécondes. C'est l'impression que j'ai ressentie, lorsque j'ai eu l'avantage il y a quelques années, d'être initié à cette science, par M. Gaston Bonnier, sous la direction duquel je me suis attaché à l'étude de questions intéressant la biologie végétale. Retenu loin de son Laboratoire de Biologie végétale de Fontainebleau, j'ai eu l'heureuse fortune de rencontrer à Rennes, chez M. le Dr Bodin, une riche collection de champignons parasites encore peu étudiés au point de vue biologique, et qu'il a bien voulu mettre à ma disposition, ainsi que son laboratoire.

Le groupe des champignons parasites a pris actuellement une place importante en pathologie humaine et animale. De remarquables études en ont été faites, tant au point de vue descriptif qu'au point de vue médical, par des savants comme Rénon, Lucet, Costantin, Matruchot

et Dassonville, Sabouraud, Bodin, Vuillemin, etc... Mais ces auteurs se sont surtout préoccupés de faire œuvre de botanistes ou de médecins ; ceux-là, s'occupant surtout de la morphologie de nos cryptogames infectieux ; ceux-ci, de leur action pathogène ; de sorte qu'après leurs remarquables recherches, il m'a semblé qu'il restait encore quelque chose à faire pour le biologiste.

L'étude physiologique et biologique de ces espèces cryptogamiques a en effet, été plus particulièrement laissée dans l'ombre, et se borne à quelques observations éparses. Il y avait donc un puissant intérêt à grouper les faits déjà connus, à tenter d'apporter quelques contributions nouvelles à l'histoire biologique de ces végétaux parasites, et à chercher ainsi à pénétrer plus avant dans leur mécanisme évolutif.

Voisins des Bactéries, dont le rôle s'élucide de plus en plus, les Champignons pathogènes forment un groupe bien caractérisé par les lésions qu'ils déterminent chez l'homme et chez les animaux. De ce fait, ils méritent d'être étudiés à part, et avec un soin particulier. Or, ce qui domine dans la physiologie de ces végétaux microscopiques, c'est à coup sûr le rôle des ferments solubles ou diastases. L'influence de ces principes encore imparfaitement connus, est considérable dans le monde vivant. Les diastases retiennent en effet sous leur dépendance les moindres phénomènes biologiques ; elles sont aussi indispensables aux microorganismes qu'aux organismes géants. Ce sont elles, qui, par un mécanisme encore inexpliqué, règlent tous les actes physiologiques accomplis par l'être vivant, et en particulier commandent les opérations analytiques et synthétiques qui transforment la matière alimentaire.

Rien je crois, ne saurait mieux rendre l'importance des diastases que ces quelques phrases de Duclaux dont les travaux ont enrichi l'histoire des diastases de précieux documents : « Il y a des actions de diastases dans toutes les cellules de tous les tissus de tous les êtres vivants...... L'œuvre physiologique qui préside à l'élimination de la queue du têtard et à la demi-castration du vieillard, est aussi bien une action de diastases que la digestion des aliments ou la respiration pulmonaire. » (1)

Les végétaux inférieurs, bactéries ou champignons microscopiques, ont ainsi en eux le facteur nécessaire à l'édification de leur propre substance ; cellulosique, protoplasmique ou autre, et peuvent utiliser les aliments si variés qu'ils trouvent à leur portée.

Les diastases aujourd'hui connues, ont été retrouvées en grande

(1) Duclaux : *loc. cit.*

partie chez ces espèces végétales microscopiques. On en a relaté un très grand nombre ; et il semblerait dépourvu d'intérêt, d'étendre ces investigations aux espèces non encore examinées à ce point de vue, étant donnés la généralité et l'extension du processus physiologique, si l'on ne s'adressait, comme je l'ai fait ici, à des cryptogames dont les mœurs biologiques toutes spéciales en ont fait des agents pathogènes de la plus haute importance

Dans son ouvrage « *Les champignons parasites de l'homme* » le Dr Bodin s'exprime ainsi : « Si certains faits nous sont connus dans ces questions de la nutrition des champignons, de l'influence des substances alimentaires sur ces plantes, et du rôle physiologique de ces mêmes substances ; il y a beaucoup d'autres faits qui demeurent inconnus et qui constituent certainement les problèmes les plus complexes de la biologie..... J'ajouterai que cette étude des diastases, infiniment complexe et délicate, est encore peu avancée malgré tous les travaux auxquels elle a donné lieu, et que, particulièrement pour les champignons parasites, elle est à peine effleurée, laissant ouvert un vaste champ que l'on peut prévoir bien loin d'être parcouru. »

Si, dans le monde vivant, la présence des diastases, constitue un fait général dont l'importance grandit de jour en jour, dans le domaine spécial des Bactéries pathogènes, les sécrétions de nature diastasique acquièrent encore une plus haute autorité par leur participation à la genèse des maladies infectieuses. Ces sécrétions sont de deux sortes : les unes, nécessaires à la vie du microbe, sont les diastases proprement dites ; les autres, de même nature que les diastases, mais nuisibles aux espèces envahies par le microphyte, sont les diastases pathogènes ou toxines.

On comprendra facilement tout l'avantage qu'il peut y avoir à chercher à étendre ces données en mycologie parasitaire, tant au point de vue des sécrétions diastasiques que des sécrétions toxiques, car on sait qu'à divers points de vue, les infections mycosiques offrent quelques analogies avec les infections bactériennes. Il se pourrait que l'élaboration possible de produits toxiques par les champignons pathogènes, donnât la clef de phénomènes mal connus dans les mycoses expérimentales et naturelles, ou tout au moins ouvrît de nouveaux horizons aux recherches touchant l'étiologie, la diagnose et la thérapeutique.

Ce travail a donc pour objet l'étude d'un groupe de champignons parasites au point de vue des phénomènes physico-chimiques qui

règlent la vie du protoplasma cellulaire, et qui se traduisent par la sécrétion de produits solubles : diastases et toxines.

La première partie, relative aux sécrétions diastasiques, comporte plus particulièrement l'étude d'un groupe d'enzymes protéolytiques assez anciennement connus : présure, caséase, trypsine et gélatinase. Je me suis surtout efforcé d'enchaîner les faits et de les faire servir à une discussion générale sur l'individualité de ces diastases, question encore fort contestée. J'ai également recherché et décelé l'émulsine dans le même groupe de champignons, puis observé la particularité que présentent leurs liquides de culture de donner une réaction du type oxydasique dans des conditions spéciales.

Dans la seconde partie de ce travail, j'ai envisagé plus spécialement les sécrétions toxiques, et exposé mes recherches personnelles en vue de déceler des toxines mycosiques. Ces recherches ont abouti à un résultat positif pour l'*Aspergillus fumigatus*. En revanche, des tentatives d'immunisation faites à l'aide de cette toxine contre l'affection aspergillaire sont demeurées infructueuses.

* * *

Ce travail a été entrepris et poursuivi à l'Ecole de Médecine de Rennes, au Laboratoire de M. Bodin, professeur de Bactériologie, dont l'autorité en mycologie parasitaire est universellement reconnue.

Je ne saurais oublier d'adresser un public hommage de reconnaissance à ce jeune et bienveillant maître qui a bien voulu s'intéresser à mes recherches et me guider dans l'emploi d'une technique ardue et toute spéciale. C'est à sa large et généreuse hospitalité, ainsi qu'à ses conseils encourageants, que je dois d'avoir accompli ce travail.

Qu'il veuille bien ici agréer l'hommage de ma plus vive gratitude et l'expression de ma parfaite reconnaissance.

Je n'oublierai pas non plus de remercier :

M. Perrin de la Touche, Directeur de l'Ecole, dont la bienveillance m'a toujours été acquise.

M. Lenormand, Professeur de Chimie, dont les précieux conseils m'ont été d'une utilité incontestable.

M. Ch. Lefeuvre, chef des travaux de physiologie qui, en des expériences délicates, a bien voulu me prêter ses lumières.

PREMIÈRE PARTIE

SÉCRÉTIONS DIASTASIQUES

CHAPITRE PREMIER

Champignons parasites et Diastases

Généralités et Historique

§ 1. GÉNÉRALITÉS BOTANIQUES SUR LES CHAMPIGNONS PARASITES.

Les Champignons parasites de l'homme et des animaux constituent un groupe mal délimité au point de vue systématique, et pour lesquels on ne peut encore songer actuellement à adopter une classification vraiment scientifique, reposant sur des caractères botaniques absolus.

Les parasites mycosiques humains ou animaux ont tout d'abord eu leur place à côté d'une foule d'espèces mycéliennes, comme eux plus ou moins bien connues, dans le groupe de Mucédinées ou Hyphomycètes. Sous ce nom, l'on désigne encore un ensemble de champignons filamenteux à thalle cloisonné et de taille réduite, dont l'appareil reproducteur consiste en conidies diverses, solitaires ou groupées de différentes façons.

Les Mucédinées jouirent au début d'une réelle autonomie ; on considérait leurs représentants comme des formes parfaites, définitives. Mais, si cette manière de voir était vraie pour quelques-uns, en revanche, des observations minutieuses montrèrent qu'un grand nombre d'espèces pouvaient produire en vue de la reproduction, autre chose que des appareils conidiens. Modifiés profondément par les influences parasitaires s'exerçant depuis de nombreuses générations ces champignons se révélaient donc dans leur vie saprophytique avec des caractères incomplets. On les désigna sous le nom *Fungi imperfecti* (champignons imparfaits).

En étudiant les aspects et les caractères nouveaux que certaines espèces pouvaient revêtir dans diverses conditions, on reconnut qu'elles n'étaient que les formes conidiennes de champignons à organes reproducteurs d'ordre élevé : Ascomycètes, Oomycètes, et même Basidiomycètes. Leur affinité ainsi dévoilée ne leur permettait plus de subsister à côté des *Fungi imperfecti* et les rapprochait d'espèces supérieures dont le cycle évolutif était parfaitement élucidé.

Sans reprendre en détail toute la question, je dois dire qu'en l'état actuel de la science, le groupe des Mucédinées a perdu de son autonomie. (1) Bon nombre de ses représentants en ont été retranchés pour être rattachés aux groupes nettement définis, auxquels leurs affinités botaniques les destinent plus exactement. Mais, ceci n'a été possible que pour ceux dont les parentés botaniques ont été bien établies ; il en reste un certain nombre qui, jusqu'à nouvel ordre rentrent encore dans le cadre des *Fungi imperfecti*.

Quant aux champignons parasites d'origine humaine ou animale ; ils revêtent dans les lésions qu'ils déterminent un aspect particulièrement dégradé ; ils y sont nettement à l'état de *Fungi imperfecti*. Dans leur vie saprophytique la plupart ne forment comme organes certains de reproduction, que des appareils conidiens. Mais, si quelques-uns d'entre eux s'obstinent à rester fixés à ce stade de fructification inférieure, pour d'autres, cette fixation n'est pas immuable, définitive ; et il arrive que dans des conditions appropriées et bien déterminées, ils ont pu nous révéler leur parenté véritable, en acquérant de nouveaux caractères existant chez des espèces plus exactement connues ; caractères qui vont parfois jusqu'à rappeler des organes fructifères d'ordre élevé, tels que des périthèces. Sans doute ce ne sont que des esquisses, des ébauches, que le parasitisme a fait avorter ; mais ils n'en constituent pas moins des documents précieux pour établir leurs affinités.

Je ne saurais oublier de dire que c'est aux travaux de mycologues français : Van Tieghem, Costantin, Matruchot et Dassonville, Sabouraud, Bodin, Vuillemin etc... que l'on doit d'avoir approfondi et étendu ces connaissances.

C'est ainsi, qu'en examinant les formes fructifères culturales des *Trichophyton* et des *Microsporum*, et en étudiant attentivement chez eux la valeur de certains organes considérés souvent comme quelque

(1) Quelquefois, mais à tort cependant, l'usage a prévalu de désigner les Champignons parasites sous le nom de Mucédinées parasites. Sans doute, cette dénomination n'a plus une valeur scientifique mais, lorsqu'on est bien convenu de sa signification, on peut l'employer sans inconvénients, surtout si l'on se place comme ici, sur le terrain biologique.

peu énigmatiques, MM. Matruchot et Dassonville ont établi qu'il existait des ressemblances bien nettes entre ces champignons et les genres *Ctenomyces* et *Gymnoascus*, et les ont rangés à côté de ces derniers dans les Gymnoascées parmi les Ascomycètes. (1)

De cette façon on a retrouvé chez *Ctenomyces serratus*, des hyphes pectinées semblables à celles des *Microsporum ;* des organes rappelant ceux qui existent chez les *Trichophyton* ; tels que : groupements en buissons conidiens des hyphes fertiles, articles fuselés et pluriseptés, filaments spiralés et crosses ramifiées. La signification de ces deux derniers organes chez les *Trichophyton* n'est plus douteuse aujourd'hui ; ce sont des ébauches de périthèce qu'un parasitisme solidement établi a empêché de se constituer.

En dehors de ces analogies, et de l'existence d'éléments périthéciaux, Matruchot et Dassonville retrouvent dans la morphologie des fructifications conidiennes des *Trichophyton* et *Microsporum* d'une part, et des *Gymoascus* et *Ctenomyces* d'autre part, une similitude de caractères qui suffiraient pour rattacher les champignons des teignes aux Gymnoascées.

Quant aux *Achorion*, leurs affinités nombreuses avec les *Trichophyton* et les *Microsporum* établies d'après divers caractères de leurs formes végétatives, (hyphes pectinées, fructifications suivant le type Acladium ou Botrytis, renflements fusiformes, existence d'Achorion trichophytoïdes) indiquent nettement qu'ils doivent être rattachés comme les premiers aux Gymnoascées. D'ailleurs on a reconnu chez eux, l'existence de filaments enchevêtrés ainsi que d'autres productions qui évoquent l'image de périthèce.

Mais, il convient de rappeler que c'est surtout par des considérations d'analogie que les champignons des diverses teignes se trouvent classés actuellement parmi les Gymnoascées ; car il n'y a pas constatation directe et constante d'une fructification supérieure parfaite, laquelle doit avoir disparu au cours de multiples générations adaptées au parasitisme. Les asques n'ont pas encore été observés ; on ne peut constater que les vestiges de la forme ascosporée disparue.

(1) MATRUCHOT et DASSONVILLE : *Sur la position systématique des Trichophyton et des formes voisines dans la classification des Champignons*. C, R. Ac. d. sc. t. CXXVIII, p. 1411, 1899.

id. *Sur les Affinités des Microsporum*, C. R. Ac d. sc, t. CXXIX, p. 123, 1899.

id. *Sur le Ctenomyces serratus, Eidam, comparé aux champignons des teignes*. Bull. Soc. myc. de Fr., XV, p. 305, 1899.

id. *Sur une forme de reproduction d'ordre élevé chez les Trichophyton* — Bull. soc. mycol. de Fr., XVI, p. 201, 1900.

id. *Eidamella spinosa, dermatophyte produisant des périthèces*. Bull. soc. myc. de Fr. XVIII, p 123-132, 1901.

Il en a été de même pour certains *Penicillium* ou *Aspergillus* qui, n'ayant jamais donné autre chose que des formations conidiennes, sont rangés dans les Périsporiacées par analogie avec les formes voisines dont on a pu suivre et reconnaître l'évolution complète.

En présence de tels faits, l'on peut se demander si de nouvelles recherches ne pourraient pas dans un avenir plus ou moins éloigné, conduire à la suppression complète du groupe des *Fungi imperfecti*, lorsque chacune des nombreuses formes conidiennes connues auraient été rattachées à des formes supérieures. Cependant, il convient de réserver, provisoirement au moins, une certaine autonomie aux *Fungi imperfecti* car, ainsi que le fait remarquer Bodin (*Les champignons parasites de l'homme*), les Mucédinées actuellement connues sont en nombre considérable et, il s'écoulera vraisemblablement un temps fort long, avant qu'elles puissent être rangées dans d'autres groupes. D'autre part, il est possible que certaines de ces Mucédinées au cours d'une longue suite de générations, et d'un régime parasitaire se soient si profondément adaptées à leurs formes de reproduction inférieures, qu'elles aient perdu la faculté de fructifier d'une autre façon. Quoi qu'il en soit, il est hors de doute que toutes les recherches propres à éclairer ce sujet présentent un puissant intérêt ; je n'en veux pour preuves que les beaux travaux de MM. Matruchot et Dassonville. Des méthodes nouvelles d'expérience (1), des considérations d'analogie permettront peut-être de trouver les réelles affinités d'une grande partie des *Fungi imperfecti* restant.

N'est-il pas évident que la connaissance approfondie de tous les caractères morphologiques et biologiques de ces parasites peut seule donner la solution des nombreux problèmes qui se posent aujourd'hui à leur égard ? Aucun fait n'est donc à négliger dans l'étude de ces cryptogames dont les diverses classifications ne reposent encore que sur des bases purement artificielles, la plupart d'ordre médical. Afin de ne pas me perdre en un sujet aussi étendu, j'ai limité mes recherches à quelques types bien nets qui sont les suivants :

1 *Aspergillus fumigatus*
2 *Rhizomucor parasiticus*
3 *Rhizopus equinus*
4 *Trichophyton gypseum*
5 *Achorion Shœnleini*
6 *Microsporum canis*

Je ne puis songer à faire une description complète et détaillée de ces espèces cryptogamiques sans sortir du cadre de ce travail ;

(1) M. Matruchot a démontré un des premiers que la variabilité des formes est la règle chez les espèces mycéliennes suivant le mode de culture ou suivant l'influence du milieu ; variabilité relative surtout à la nature ou à la forme de l'appareil reproducteur. — (Thèse sc. nat., Paris 1892).

d'ailleurs, il existe de nombreux ouvrages spéciaux où elles sont décrites avec les caractères de toute nature qui leur sont propres. Les plus remarquables sont ceux de Gedœlts, Guéguen, Bodin, Blanchard, Roger, dont l'indication bibliographique est donnée à la fin de ce travail. Je me bornerai seulement à donner ici, et sommairement, les caractères les plus généraux des six espèces étudiées.

Aspergillus fumigatus (Fresenius). — Cette espèce, d'après Van Tieghem et Blanchard appartient aux Périsporiacées parmi les Ascomycètes. Décrite en 1863 par Frésenius. elle a été observée dans les organes de divers animaux ; en particulier dans les voix respiratoires des oiseaux ; elle peut envahir différents organes chez les mammifères y compris l'homme.

(Les caractères pathologiques de cette espèce sont décrits plus spécialement dans la seconde partie de ce travail.)

Caractères morphologiques. — L'appareil végétatif est constitué par des filaments mycéliens ramifiés et cloisonnés ; les rameaux fructifères sont dressés et se terminent par un renflement claviforme sur lequel naissent les stérigmates ou basides. Les stérigmates ne sont pas ramifiés et supportent chacun une série de spores arrondies lisses de 2,5 à 3 γ de diamètre qui se détachent facilement. Au début, les fructifications conidiennes ont une coloration claire qui fonce peu à peu.

Caractères culturaux. — L'*Aspergillus fumigatus* croît entre 20 et 50°, mais sa température optimum est de 37°.

A cette température la moisissure se développe admirablement bien sur le liquide de Raulin ; elle forme d'abord un tapis blanc, qui verdit peu à peu et devient brunâtre au bout de 5 à 6 jours ; la partie du mycélium en contact immédiat avec le liquide de culture est crème-jaunâtre.

La couleur des spores varie avec les milieux employés ; verdâtre en général sur les milieux acides ; brun noirâtre sur les milieux alcalins ou neutres. Cette dernière couleur que possèdent le plus souvent les spores, donne à la culture un aspect fumé caractéristique.

Rhizomucor parasiticus. — Cette espèce a été établie par Lucet et Costantin (1) : elle est pathogène pour le lapin, le cobaye, la poule, en injections intra-veineuses ou péritonéales seulement ; non pour le chien. Les mêmes auteurs l'ont trouvée chez une femme atteinte d'une affection des voix respiratoires ; mais ils l'ont retrouvée aussi dans les poussières provenant d'une vache teigneuse. L'origine saprophytique de cette espèce serait ainsi très vraisemblable. Les inoculations de spores au lapin, par voie veineuse, amènent dès le cinquième jour la mort de l'animal avec des phénomènes convulsifs. A l'autopsie, le foie est congestionné, la rate présente de petits tubercules, et les reins laissent voir des lésions très marquées.

(1) Lucet et Costantin : — *Rhizomucor parasiticus espèce pathogène de l'homme.* — Revue générale de Bot., XII, 1900. p. 81. et Arch. de Parasit., t. IV, 3, 1901.

Caractères morphologiques. — Le mycélium gazonnant a une couleur gris de plomb ou gris souris qui passe au brun fauve. Les pédoncules sporangifères sont ramifiés en grappe ou en corymbe, et supportés par des rhizoïdes irréguliers. Les sporanges, sphériques, possèdent une membrane brune hérissée de fines aiguilles cristallines ; la columelle est ovoïde, légèrement cutinisée. Les pédoncules latéraux portent des sporanges plus petits ; les spores sont rondes, ovoïdes.

Lucet et Costantin considèrent cette espèce comme un terme de passage ; elle présente en effet des caractères de transition entre les genres *Mucor* et *Rhizopus*. Elle s'éloigne du premier par l'existence des filaments rampants et de rhizoïdes ; elle se distingue du second, par la ramification des pédoncules sporangifères et la forme de la columelle. Pour ces raisons Gedœlst en a fait un genre spécial.

Caractères culturaux. — Le *Rhizomucor parasiticus* croît avec facilité sur les milieux sucrés ou glycérinés ; la température optimum de son développement est de 38 à 40°. Au-dessous de 20° il ne se développe pas. A 50° la croissance devient déjà difficile ; enfin à 60° le champignon ne végète plus. Sur pomme de terre, sur moût de bière gélosé, sur bouillon de viande, bouillon de peptone ou gélatine, la croissance se fait également bien.

Rhizopus equinus. — Cette espèce a été décrite par Costantin et Lucet (1) ; elle a été rencontrée sur un cheval. Inoculée au lapin, elle amène la mort en trois ou quatre jours. A l'autopsie, le foie est congestionné, les reins ainsi que les ganglions mésentériques offrent des lésions. La poule semble réfractaire d'après Costantin et Lucet.

Caractères morphologiques. — Le mycélium est constitué par une partie rampante plongeant à l'intérieur du substratum ; et par une partie aérienne sur laquelle naissent de place en place des crampons nombreux et ramifiés (rhizoïdes) groupés par faisceaux constituant la partie submergée du champignon. Au-dessus de ces sortes d'attaches s'élèvent les hyphes sporangifères réunies elles aussi en faisceaux. Mais, ces hyphes naissent d'abord isolées, simples, et d'ordinaire sans rhizoïdes (caractères de *Mucor*). Plus tard, elles se trouvent en bouquets et pourvus de rhizoïdes, (caractère de *Rhizopus*). Les sporanges sont globuleux, les spores arrondies.

Caractères culturaux. — Le *Rhizopus equinus* pousse bien sur divers milieux ; le mycélium d'abord blanc, devient floconneux, et l'on distingue de nombreuses petites têtes noires qui sont les sporanges.

Ces éléments diversement colorés donnent à l'ensemble de la culture une teinte grise. Puis, les filaments mycéliens prennent de plus en plus d'importance, s'enchevêtrent et donnent un feutrage excessivement volumineux qui remplit les tubes de culture. La température optimum est au voisinage de 37°. Il pousse mal sur Raulin, mais végète avec facilité sur les milieux glucosés peptonisés ou glycérinés peptonisés, ou bien sur le bouillon gélosé et la pomme de terre.

(1) Costantin et Lucet : *Sur un Rhizopus pathogène.* Bull. soc. myc. Fr., p. 200, XIX, 3, 1903.

Trichophyton gypseum. — Ce champignon désigné ainsi par Bodin (1901) est également connu sous le nom de *Trichophyton mentagrophytes* (Ch. Robin). Il a été décrit par Sabouraud sous le nom de pyogène du cheval ; plus tard, Bodin en a repris l'étude (1). Cette espèce, d'origine animale, se rencontre dans les affections appelées trychophyties, consistant en lésions variées ayant leur élection sur la peau humaine. Elle cause des inflammations profondes ; ou bien provoque seulement des accidents superficiels (tondante de l'enfant). Les accidents habituels occasionnés par le *Tr. gypseum* sont : le *Kerion Celsi* du cuir chevelu et le sycosis de la barbe ; l'aspect de la lésion est variable avec la région attaquée. Le champignon vit aussi sur le bœuf, le mouton, le chien ; les poils se remplissent de chapelets mycéliens. Inoculé au cobaye, le *Tr. gypseum* cause une trichophytie serpigineuse rebelle. En outre, inoculé dans le tissu sous-cutané du cobaye, le champignon détermine un abcès purulent, ce qui établit son pouvoir pyogène.

Caractères morphologiques. — L'appareil végétatif, dans la vie saprophytique, se montre formé de filaments mycéliens très cloisonnés, se ramifiant le plus souvent à angle droit

L'appareil conidien est le plus généralement, représenté par de petites conidies supportées ordinairement par des stérigmates qui donnent à l'ensemble un aspect en grappe : c'est la fructification suivant le mode *Botrytis*. Un autre type de conidies est représenté par de gros éléments fuselés, cloisonnés latéralement. Ces grosses conidies fuselées se trouvent soit à l'extrémité d'un rameau latéral, soit à l'emplacement d'une petite conidie sur la grappe même. Enfin, il y a production d'organes spéciaux : les uns en forme de vrille, les autres en forme de crosse ramifiée. Ces organes quelque peu énigmatiques ont été assimilés par Matruchot et Dassonville à des ébauches de périthèce. Ces savants ont en effet retrouvé des formations analogues dans la constitution du périthèce d'une Gymnoascée; le *Ctenomyces serratus*. Ce caractère joint à ceux qu'ils ont observés dans les formes culturales inférieures des deux champignons comparés, leur ont permis de rattacher les Trichophyton aux Gymnoascées. Néanmoins, les asques n'ont pas encore été observées chez les Trichophyton.

Des chlamydospores apparaissent dans les cultures vieilles.

Il faut aussi rappeler que dans les cultures prend souvent naissance une forme duveteuse blanche, caractérisée par des hyphes fertiles grêles du type *Acladium*.

Caractères culturaux. — Cette espèce se développe rapidement sur tous les milieux et avec une intensité remarquable ; elle donne une culture constamment blanche et d'aspect plâtré. Sur Sabouraud maltosé, la culture présente un centre saillant ombiliqué ; elle forme une plaque duveteuse blanche avec très souvent des rayons plâtreux blancs. Sur moût agarisé, l'aspect est à peu près le même ; la surface est un peu plus gaufrée, avec des sillons grisâtres. Sur pomme de terre, le champignon forme une large traînée blanche, duveteuse au début, puis devenant plâtreuse et surélevée ensuite. La température optimum est de 30 à 33° ; les milieux neutres.

(1) Bodin : *Les teignes tondantes du cheval et leurs inoculations humaines*. Thèse de Paris, 1896.

Achorion Schœnleini. — Ce champignon découvert par Shœnlein en 1839 est l'agent de la teigne faveuse ou favus, affection du cuir chevelu. Décrit par Grüby en 1841 il a été l'objet d'études nombreuses en raison de la discussion soulevée par l'unicité ou la pluralité des champignons faviques. L'homme, la souris, le lapin, la poule y sont nettement sensibles ; le chien, le chat, la guenon y sont réfractaires. Le favus, lésion causée par l'*Achorion* se traduit par la production de godets faviques, petites masses jaunes déprimées au centre, qui servent d'habitat aux éléments du champignon. En outre les poils envahis par le parasite sont altérés ; ils s'épilent facilement. Le favus s'observe chez l'homme surtout pendant la jeunesse ; il se transmet avec facilité.

Caractères morphologiques. — Ce champignon est constitué par des filaments mycéliens irréguliers, ondulés et enchevêtrés. A l'extrémité des filaments, ou plus rarement sur leurs parties latérales, se rencontrent des renflements ovoïdes connus sous le nom de corps jaunes et remplis de protoplasme granuleux. Ces productions équivalent à de simples chlamydospores, formes de résistance de la plante La forme de reproduction habituelle, la plus constante, consiste en cellules ovoïdes ou *gemmes* de Costantin et Sabrazès ; c'est la fructification suivant le mode *Oospora*. Cependant, Sabouraud a pu y reconnaître la fructification suivant le type *Acladium;* caractère, qui avec quelques autres, (production d'hyphes pectinées, formes trichophytoïdes, organes fusiformes) permet de rapprocher les Achorion des Trichophyton et des Microsporum, et par suite de les ranger avec eux parmi les Gymnoascées. Quant aux formes fructifères supérieures, elles n'ont pas encore été nettement caractérisées et se limitent à l'observation (Sabouraud) de quelques enchevêtrements que l'on croit être l'indice de périthèces avortés.

Caractères culturaux. — La croissance de l'*Achorion Shœnleini* s'effectue ordinairement bien sur les mêmes milieux que les Trichophyton ; mais elle a lieu beaucoup plus lentement que pour ces derniers. Sur gélose peptonisée, le champignon prend un aspect cérébriforme et une couleur gris blanc ; sur pomme de terre, il forme de petites masses mamelonnées grises ou blanchâtres.

Microsporum canis (Bodin 1897) (1). — Cette espèce détermine chez le chien une tondante à petites spores, transmissible à l'homme chez lequel elle produit une tondante très analogue à la tondante rebelle due au *Miscrosporum Audouini*. L'inoculation expérimentale au cobaye se fait facilement ; elle occasionne une légère rougeur accompagnée de desquamation : la tondante entre peu à peu en voie de régression et disparaît au bout de un mois à un mois et demi.

Caractères morphologiques. — Dans ses cultures le *Microsporum canis* revêt les caractères généraux du *Microsporum Audouini*. Les filaments mycéliens sont plus ou moins ramifiés, et cloisonnés de distance en distance. Sur certains d'entre eux prennent naissance des renflements ovoïdes devenant pour la plupart ultérieurement, des chlamydospores destinées à être mises en liberté. Fréquemment aussi, on observe la production d'hyphes

(1) Bodin et Almy : *Le Microsporum du chien*. Recueil de méd. vétérinaire 8e série, t. IV, 1897.

pectinées. Ce sont là, deux caractères utiles pour le diagnostic de l'espèce. La fructification se fait, soit à l'aide d'organes en fuseaux pluriseptés garnis extérieurement de petits piquants, soit à l'aide de conidies latérales petites et sessiles. Par ces caractères, le *Microsporum canis* se rapproche des autres Microsporum et des Trichophyton. D'après celà, et, par suite d'autres considérations d'analogie avec le genre *Ctenomyces*, Matruchot et Dassonville rattachent les Microsporum aux Gymnoascées.

Caractères culturaux, — Sur agar au moût de bière, le champignon cultive bien et forme dès le deuxième jour une touffe blanche duveteuse. Des rayons duveteux fins et serrés naissent vers la périphérie et donnent un gazon moins élevé qu'au centre, et jaunâtre. Sur gélose peptonisée et glucosée, la culture est très abondante et donne un tapis duveteux ordinairement uniforme avec une petite élevure au centre. Sur pomme de terre elle forme une traînée duveteuse avec coloration brun-rougeâtre caractéristique, sur les bords de la culture.

---

§ 2. GÉNÉRALITÉS SUR LES DIASTASES.
DIASTASES DÉCELÉES JUSQU'A CE JOUR CHEZ LES CHAMPIGNONS INFÉRIEURS.

Les ferments solubles appelés aussi diastases ou enzymes, sont des substances depuis longtemps connues. Soupçonnées à une époque fort ancienne, alors que les phénomènes intimes de la digestion soulevaient de savantes polémiques, leur étude véritablement scientifique ne commença qu'avec les travaux de Pasteur sur la génération spontanée et les fermentations.

Les diastases sont des substances organiques encore mal connues chimiquement, très actives, qui réagissent dans des conditions bien déterminées pour provoquer des transformations d'un système en un autre plus stable. Après la transformation qu'elles ont opérée, on les retrouve intactes, et capables d'agir à nouveau. Les diastases ont en effet, comme propriété capitale, celle de ne pas se détruire en agissant ; semblables en cela à certaines substances minérales appelées catalyseurs. Ce sont des catalyseurs organiques, comme on les appelle quelquefois.

Les phénomènes produits par les diastases sont analogues à ceux que produisent beaucoup de ferments organisés. C'est qu'en effet, ces derniers n'agissent sur les substances fermentescibles que par les diastases qu'ils sécrètent, et il est admis que toutes les réactions des ferments organisés sont l'œuvre de leurs sécrétions diastasiques.

Les propriétés des diastases sont assez nombreuses, mais aucune n'est absolue ; car il existe des substances chimiques qui agissent à la

façon de certaines diastases. La mousse de platine, les acides dilués en particulier, possèdent les propriétés fondamentales des diastases : disproportion entre la cause et l'effet ; inaltération après l'action.

D'autre part, on ne sait pas encore obtenir les diastases parfaitement pures, et l'on ignore leur constitution chimique exacte.

Devant cette difficulté à caractériser d'une manière absolue les ferments solubles, ne pouvant s'appuyer ni sur des propriétés bien spécifiques, ni sur une constitution connue, on a essayé de les définir par leur mode d'action et par les substances sur lesquelles cette action s'exerce. C'est sur des caractères de cet ordre que reposent les principales nomenclatures qui ont été proposées pour les diastases.

La plus généralement adoptée est celle de Duclaux. Les diastases s'y trouvent groupées en familles naturelles, d'après les réactions auxquelles elles donnent naissance. Le plus souvent leur nom rappelle la substance sur laquelle elles agissent.

Le mécanisme d'action des diastases est encore un peu obscur ; on a tenté de l'expliquer par des phénomènes d'ordre physique. Naegeli admit que les diastases possèderaient des propriétés vibratoires modifiant l'arrangement moléculaire des substances sur lesquelles elles exercent leur action. Jager admet lui-même que les enzymes agiraient non comme des substances, mais bien comme des forces ; et Arthus (1), en s'appuyant précisément sur ce que les propriétés des diastases sont pour la plupart, partagées par des agents impondérables tels que la chaleur, l'électricité, le magnétisme, etc., conclut que les enzymes sont, non des substances, mais des propriétés de substances.

De là, naquit la théorie des enzymes-propriétés qu'on opposa à la théorie des enzymes-substances On se trouve encore actuellement en présence de ces deux théories, lesquelles, malgré leurs arguments respectifs, ne sont ni l'une ni l'autre parfaitement démontrées. Cependant, bien qu'on ne puisse encore ranger les diastases à leur véritable place parmi les substances chimiques, la théorie des enzymes-substances est celle qui répond encore le mieux à la généralité des phénomènes diastasiques.

Dès que les diastases eurent été observées dans le monde vivant chez les êtres supérieurs, on songea bientôt à révéler leur présence chez les organismes microscopiques, bactéries ou champignons, qui pullulent autour de nous, et qui sont les agents puissants du retour à

(1) Arthus : *Nature des enzymes*. Thèse de Doctorat. Paris 1896.

l'atmosphère de tout ce qui a vécu, rétablissant ainsi l'équilibre de la vie.

Parmi les champignons, le groupe des Aspergillées, qui a de nombreux représentants dans la nature, se prête facilement aux observations de ce genre ; et c'est en effet chez ces végétaux qu'on a le plus souvent recherché la présence de diastases et étudié leur action.

Les Mucédinées ont apparu de bonne heure comme les agents de transformation des substances sur lesquelles elles vivent.

En 1867, M. Van Tieghem (1), étudiant la transformation du tannin en acide gallique, reconnaît qu'elle résulte de l'action de Mucédinées *(Aspergillus niger, Penicillium glaucum)* vivant dans le liquide tannique de la noix de galle; leurs mycéliums pouvaient sécréter la diastase propre à fixer une molécule d'eau sur le tannin pour en faire de l'acide gallique. M. Van Tieghem a recherché cette diastase dans le mycélium en pleine évolution; mais elle devait être trouvée plus tard dans le liquide sous-jacent, par Fernbach.

En 1878, Gayon (2), cultivant l'*Aspergillus niger* dans un liquide renfermant du sucre de canne, remarqua que ce dernier se transformait peu à peu en sucre interverti; cette action ne pouvait s'exercer que par la production d'une diastase analogue à celle que Berthelot (3) entrevit en 1860, et que Béchamp (4) isola en 1864 : l'invertine ou sucrase.

En 1883, Duclaux (5) indique en différents endroits de sa Chimie biologique les sécrétions diastasiques de quelques Mucédinées. Avec les cultures d'*Aspergillus niger*, de *Penic. glaucum* et d'*Aspergillus glaucus*, il obtient, par un procédé bien connu qu'il décrit, une solution de sucrase très active. Il décèle également chez ces Mucédinées, l'amylase, la présure et la caséase. Dans l'urine, il constate la présence d'une Mucédinée du groupe des Aspergillus, pouvant effectuer la transformation de l'urée en carbonate d'ammoniaque, comme le fait la diastase retirée de l'urine, en 1876, par Musculus (6).

Bourquelot et Graziani (7), recherchant la nature des ferments solubles sécrétés par le *Penicillium Duclauxii*, moisissure trouvée

(1) Van Tieghem : *Recherches pour servir à l'histoire physiologique des Mucédinées.* Ann. sc. nat. bot. ; t. VIII. p. 210, 1867.

(2) Gayon : *Sur l'inversion et la fermentation alcoolique du sucre de canne par les moisissures.* C. R. Ac. d. sc., t. LXXXVI, p. 52, 1878.

(3) Berthelot : *Sur la fermentation glucosique du sucre de canne,* C. R. Ac. d. sc., t. L, p. 980, 1860.

(4) Béchamp : *Sur la fermentation alcoolique* C. R. Ac. d. sc., t. LVIII, p. 601, 1864.

(5) Duclaux : *Chimie biologique in Fremy Encyclopédie.* t. IX, 1re sect. p. 142, 164, 193, 702, Paris, 1883.

(6) Musculus : C. R. Ac. d. sc. t. LXXXII, p. 333, 1876.

(7) Bourquelot et Graziani : Bull. Soc. myc. de Fr., t. VIII, p. 147, 1892.

par Delacroix sur des raisins de Tunisie, y trouvent de l'invertine. En 1893, M. Bourquelot (1) publie un grand nombre d'observations sur les sécrétions diastasiques qu'il a observées chez quelques Aspergillus. Il étudie l'activité de l'invertine produite par l'*Aspergillus niger* ; plus tard, il a noté (2) la production par cette même moisissure, d'une foule d'autres diastases agissant sur divers hydrates de carbone. Ce sont : la tréhalase, la maltase, et des enzymes de polyglucoses, tels que le raffinose, le mélézitose, le gentianose. Il constate la production par la même moisissure, d'amylase, d'inulase, et de ferments protéolytiques analogues à la présure, la caséase, la trypsine et la gélatinase. Il y rencontre aussi l'émulsine, que Gérard (3) trouve en même temps chez le *Penicillium glaucum.*

En 1896, J. Laborde (4) étudie une Mucédinée nouvelle rencontrée sur un empois d'amidon exposé à l'air. Cette Mucédinée, l'*Eurotiopsis Gayoni*, sécréte un grand nombre de diastases, sauf de la sucrase, ressemblant en cela à tous les Mucors connus. Ces diastases sont : l'amylase, la dextrinase, la maltase, la lactase, la tréhalase, l'émulsine, la caséase, la zymase de Büchner.

Gérard (5), en 1897, extrait une lipase des liquides de culture du *Penicillium glaucum.* Fernbach (6), en 1901, isole la tannase du liquide de culture de l'*Asp. niger.* La même année, MM. Bodin et Lenormand (7) signalent la production de présure, de caséase et de gélatinase par une Mucédinée parasite, la forme *Oospora* du *Miscroporum* du cheval.

En 1902, Pinard (8) a décelé les diastases suivantes dans le liquide de culture de l'*Aspergillus repens* : invertine, tréhalase, maltase, ferments du mélézitose et du raffinose, amylase, inulase, émulsine, tannase, ferments de la caséine. Il rencontre aussi dans les produits de sécrétion de l'*Aspergillus clavatus,* les mêmes ferments solubles, sauf la tannase.

(1) Bourquelot : *Ferments solubles de l'Aspergillus niger,* Bull. Soc. mycol. de Fr., t. IX, p. 232, 1893

Bourquelot : *Recherches sur les ferments solubles sécrétés par l'Aspergillus niger et le Penicillium glaucum.* C. R. Soc. biol., t. V, p. 653, 1893.

(2) Bourquelot : Journal de phys. et chimie. 6e série, t. III, p. 390 ; t. IV, p. 385, 1899 et t. VII, p. 369, 1898.

(3) Gérard : *Présence dans le Penicillium glaucum d'un ferment agissant comme l'émulsine.* C. R. Soc. de Biol., t. V, p. 651, 1893.

(4) J. Laborde : *Recherches physiologiques sur une moisissure nouvelle.* Thèse de Paris 1896.

(5) Gérard : *Sur une lipase végétale extraite du Penicillium glaucum.* Journal de phys. et de chimie. 6e série, t. V, p. 529, 1897.

(6) Fernbach : *Sur la tannase.* C. R. Ac. des Sc., t. CXXXI, p. 1214, 1901.

(7) Bodin et Lenormand : *Sur la production de caséase par un Streptothrix parasite.* Ann. de l'Inst. Pasteur, t. XV, p. 285, 1901.

(8) Pinard : *Ferments solubles sécrétés par l'Asp. repens et l'Asp. clavatus.* Thèse pharmacie. Bordeaux, 1902.

En 1903, Ch. Garnier (1) décèle la lipase dans les liquides de culture des espèces cryptogamiques suivantes : *Asp, fumigatus*, *Asp. flavus*, *Asp. glaucus*, *Sterigmatocystis nidulans*, *Sterig. nigra*, *Sterig. versicolor*.

Enfin, il convient aussi de signaler les moisissures dont le mécanisme biologique a pu servir à des opérations industrielles, par les diastases qu'elles sécrètent.

Dans certaines contrées d'Extrême-Orient, on a depuis longtemps utilisé les levures et les moisissures pour fabriquer diverses boissons, à l'aide des substances premières sur lesquelles ces organismes exercent leur action.

Gayon et Dubourg (2), en 1887, établissent que quelques Mucorées, telles que : le *Mucor alternans* et le *Mucor racemosus*, peuvent saccharifier la dextrime et, en même temps, produire la fermentation du maltose formé, de sorte que la saccharification et la fermentation se font en une seule opération. Ces deux espèces sont sans action sur le saccharose, ne produisant pas d'invertine.

En 1882, Atkinson (3) rapporte une série d'observations qui constituent nos premières connaissances sur la fabrication du koji, sorte de levain avec lequel on prépare une bière japonaise, le saké. Provenant du riz *cuit*, le koji ne saurait être pourvu d'une activité diastasique analogue à celle de l'orge germé. L'agent actif du koji, ainsi que l'a signalé Atkinson, est une Mucédinée longtemps appelée *Eurotium orizæ*, mais qui est, d'après Wehmer, l'*Aspergillus orizæ*. L'expérience prouve que ce dernier sécréte de l'invertine, et surtout une autre diastase, laquelle, bien qu'étant voisine de l'amylase, en diffère par sa propriété d'amener l'amidon jusqu'au terme glucose. Wroblewsky, qui l'a étudiée, l'appelle takadiastase. La fermentation alcoolique qui s'établit ensuite dans le koji est due à des levures qu'on y rencontre d'une façon constante.

A Java, des opérations analogues sont utilisées pour la fabrication de l'arack, boisson spiritueuse. D'après Went et Prints Gerlings, les espèces saccharifiantes seraient ici au nombre de deux : le *Chlamydomucor orizæ*, puis le *Rhizopus orizæ*, que les auteurs ne garantissent pas être différent de l'espèce précédente.

(1) Ch. Garnier : *Lipase dans A. fumigatus, A. flavus, A. glaucus, St. nigra, St. nidulans, St. versicolor*. C. R. Société de Biol., t. LX, novembre et décembre, 1903.

(2) Gayon et Dubourg : *De la fermentation de la dextrine et de l'amidon par les Mucorées*. Ann. de l'Inst. Pasteur t. V. 1887.

(3) Atkinson : *The Chemistry of Saké*. Brenning (Univ. de Tokio, 1881).

Wehmer distingue encore une autre espèce d'Aspergillus voisine de l'*Asperg. orizæ*, et qu'il appelle *Asperg. Wentii* : elle intervient aussi dans la fabrication d'un condiment à Java.

En 1892, M. Calmette (1), étudiant les méthodes employées en Extrême-Orient dans les distilleries, a retiré d'une levure chinoise, employée à la fabrication de boissons alcooliques dont la matière première est le riz, une moisissure qu'il nomma *Amylomyces Rouxii*. Cette Mucédinée agit à la façon de l'amylase du malt, de l'*Aspergillus orizæ* et des *Mucor alternans* et *racemosus* ; elle possède la double propriété de saccharifier et de faire fermenter les substances amylacées. Mais, comme les Mucors, et à l'encontre de l'*A. orizæ*, elle n'intervertit pas le saccharose faute d'invertine. M. Boidin (2), dans des opérations industrielles, a remplacé l'*Amylomyces Rouxii* par divers mucors qu'il nomme *Mucor* β *et* γ, et qui sont plus ou moins voisins des *Mucor alternans* et *M. racemosus*.

On voit tout l'intérêt industriel que présentent de pareils végétaux, qui possèdent en eux-mêmes ce que le malt et la levure de bière n'apportent que séparément. L'étude des diastases des Mucédinées présente donc un réel intérêt scientifique, doublé parfois d'un intérêt industriel et économique.

Cet aperçu historique révèle en somme que tous ces microphytes sont quelquefois d'importants producteurs de diastases ; il montre en outre que les Aspergillées ont été à peu près seules, examinées à cet égard, et que les champignons parasites sont dans cet ordre d'idée encore peu étudiés.

---

(1) Calmette : *Contribution à l'étude des ferments de l'amidon. La levure chinoise.* Ann. de l'Inst. Pasteur, p. 604, 620, 1892.

(2) Boidin : *Bulletin de l'association des chimistes de sucrerie et de distillerie.* 1899.

CHAPITRE II

Transformations de quelques substances protéiques sous l'influence directe de quelques champignons parasites.

Parmi les aliments qui conviennent particulièrement bien à l'alimentation des champignons inférieurs, se placent en première ligne les substances albuminoïdes. Comme tant d'autres aliments, elles ne sont assimilées qu'après avoir subi l'action de diastases qui les transforment. On désigne généralement sous le nom de protéolyse l'acte par lequel s'opèrent ces modifications digestives, sans spécifier la nature du corps protéique et celle de l'enzyme qui entrent en jeu.

Les ferments solubles protéolytiques connus à l'heure actuelle sont nombreux, et leur nombre est encore appelé à s'accroître dès que la constitution des matières albuminoïdes nous sera mieux connue. Parmi eux, il en est qui sont d'introduction assez récente, la kinase, l'érepsine, etc., mais, ce sont les plus anciennement connus qui ont plus spécialement attiré mon attention : la présure, la caséase, la trypsine, la gélatinase. On n'est pas encore complètement d'accord sur l'individualité de quelques unes de ces diastases. L'étude que j'en ai faite sur divers champignons parasites m'invitait à reprendre cette question encore obscure et mal précisée, de la spécificité de ces enzymes protéolytiques. Si la modeste contribution que j'apporte ici, n'est pas de nature à faire la lumière définitive, elle pourra néanmoins, en s'ajoutant aux résultats déjà connus, faciliter les recherches dans cette voie.

§ 1. MODIFICATIONS PHYSIQUES ET CHIMIQUES ÉPROUVÉES PAR LA CASÉINE DANS LE LAIT.

Présure et caséase sont deux diastases antagonistes dont la coexistence a été fréquemment observée chez les espèces animales ou végétales,

Elles agissent sur une substance albuminoïde spéciale, la caséine ; la première pour la coaguler, la seconde pour la solubiliser. Leur présence simultanée dans quelques organismes vivants a de bonne heure été signalée ; Duclaux (1) les a découvertes un des premiers chez les organismes inférieurs ; il les a rencontrées chez les Tyrothrix variés qui peuplent le lait exposé à l'air, et qui sont les précieux agents de l'industrie fromagère. Boullanger (2), ainsi que Geret et Hahn (3) les ont trouvées chez quelques levures, et MM. Bodin et Lenormand (4) ont révélé leur présence chez une Mucédinée parasite, la forme *Oospora* du *Microsporum* du cheval. Je rappellerai aussi pour mémoire, que M. Javillier a récemment décelé la présure dans un grand nombre de Phanérogames et, chez quelques-unes d'entre elles, associée à la caséase. Je me suis demandé si cette production de présure et de caséase ne s'effectuait pas chez un plus grand nombre de végétaux inférieurs, et en particulier chez les champignons parasites, si étranges par leur mode de vie, où cette étude n'a pas encore été faite avec toute l'amplitude qu'elle comporte.

Dans ce but, les microorganismes en question ont été ensemencés sur du lait bien pur, complètement débarrassé de sa matière grasse par un écrémage mécanique. Le lait constitue dans ces conditions un réactif propre à caractériser une action coagulante et décoagulante. Par sa composition chimique, il réalise d'ailleurs un excellent milieu de culture naturel.

Les espèces cryptogamiques que j'ai ensemencées sur lait sont les suivantes :

Aspergillus fumigatus, Rhizopus equinus, Rhizomucor parasiticus, Mucor corymbifer, Trichophyton gypseum, Tr. violaceum, Microsporum Audouini, Microsp. canis, Achorion Shœnleini, Ach. Quinckeanum, Actinomyces bovis, Streptothrix de Vallée.

Ces espèces sont mises à cultiver sur 75cc, de lait dans des matras placés à l'étuve à 22°. Ils y croissent rapidement en faisant subir au lait des modifications graduelles d'ordre physique et chimique, sous l'action des diastases qu'ils sécrètent.

Ces modifications, très apparentes, et faciles à observer, se produisent

(1) Duclaux : *Mémoires sur le lait.* Ann. Institut agronomique. 1880. 1882. 1883. 1884.

(2) Boullanger : *Contribution à l'étude de quelques levures de bière.* Ann. Inst. Pasteur, t. X. p. 598, 1896.

(3) Geret et Hahn : Ber. d. d. ch Ges., t. XXXI, p 202, 1898.

(4) Bodin et Lenormand : *Sur la production de caséase par un streptothrix parasite.* Ann. Inst. Pasteur, t. XV, p. 285, 1901.

suivant le même processus général avec toutes les espèces en expérience. Le lait s'épaissit jusqu'à la formation d'un coagulum. Ce coagulum ne devient jamais très cohérent; il reste toujours un peu gélatineux ; puis il diminue encore de consistance et en même temps d'opacité, pour se transformer peu à peu en un liquide trouble, légèrement opalescent, ou dans certains cas, fortemement coloré. Indépendamment de toute trace d'organismes vivants, ce liquide filtré à la bougie est capable d'opérer sur un lait stérile, les mêmes transformations qu'il a lui-même subies sous l'influence directe du champignon, c'est-à-dire, coagulation, puis liquéfaction du coagulum formé. Il perd cette faculté si on le chauffe à 100°. Ce sont bien là des phénomènes purement diastasiques; et les champignons en question sont évidemment producteurs de présure et de caséase.

Si, dans les grandes lignes tout se passe suivant ce shéma, on observe en réalité des variations de détail pour chaque espèce ; chacune d'elles réalisant en des temps différents, et à des degrés variables, les transformations que je viens d'indiquer. La différence concerne surtout les vitesses de coagulation et de décoagulation, le degré de fermeté du coagulum, la coloration du liquide résiduel etc. Chaque espèce prend aussi sur le lait un aspect caractéristique, dit aspect cultural, qui lui est propre, et qui diffère un tant soit peu de celui qu'elle possède sur les autres milieux usuels.

Voici en résumé, les observations que j'ai faites sur les caractères morphologiques de quelques espèces mycéliennes en végétation sur le lait, et les modifications présentées par ce dernier liquide au cours de leur développement.

Aspergillus fumigatus. — Les quelques spores tombées à la surface du lait au moment de l'ensemencement, y produisent un piqueté verdâtre au bout du troisième jour, et déjà le lait est coagulé. Le mycélium se développe peu à peu, forme une nappe continue, de couleur grise, tachetée de vert, puis acquiert bientôt la teinte fumée caractéristique de l'*A. fumigatus*. Le coagulum augmente de fermeté ; il est surmonté de la couche aqueuse du petit lait. Vers le septième jour, sa liquéfaction commence et se poursuit très apparemment ; la caséine solide disparait peu à peu et, au vingtième jour, il ne reste plus sous le mycélium qu'un liquide brun jaunâtre, contenant en suspension un reste de caséine, non encore solubilisée, et un dépôt formé par les sels insolubles du lait.

Rhizopus equinus. — Au bout du troisième jour qui suit l'ensemencement, le mycélium s'est développé uniformément sur la surface du lait ; il forme une couche feutrée, lâche, d'une hauteur de 2 cent. 1/2 ; sa couleur est alors blanche. Au bout du quatrième jour, le lait est coagulé et, déjà on

peut observer une liquéfaction graduelle du coagulum qui se propage de la surface vers le fond. La culture devient entièrement grise et ne forme plus qu'une couche de faible épaisseur, à filaments serrés. Au bout de vingt à vingt-cinq jours, il ne reste plus qu'un liquide très mobile, rouge brun, avec un dépôt constitué par un reliquat de caséine et par des sels insolubles (phosphates).

Rhizomucor parasiticus. — Dès le cinquième jour qui suit l'ensemencement, le mycélium se présente avec un aspect floconneux, blanc, couvrant toute la surface du substratum ; puis il passe à la couleur gris de plomb et devient finalement brun fauve. La coagulation apparaît entre le septième et le dixième jour ; toutefois le coagulum manque encore de cohérence et de fermeté. Sa liquéfaction s'opère graduellement et aboutit en dernier lieu à un liquide résiduel brun foncé, presque noir.

Trichophyton gypseum. — Sur lait, ce champignon revêt son aspect plâtreux ordinaire. La culture présente des crêtes cérébriformes, séparées par des dépressions rayonnantes qui donnent à la surface du mycélium un aspect godronné caractéristique. La coagulation apparaît ici vers le dixième jour. Le coagulum reste mou, diffluent, et se liquéfie lentement pour donner naissance à un liquide rougeâtre, limpide et très mobile.

Mucor corymbifer. — Le coagulum n'est apparu nettement que dix jours après l'ensemencement ; il n'a pas de fermeté et reste à l'état muqueux. Au bout du vingtième jour, le mycélium couvre presque toute la surface du liquide ; il a environ 1 cent. d'épaisseur. Le coagulum est alors surmonté d'une mince couche de liquide jaunâtre, et sa liquéfaction s'effectue progressivement pour être achevée à peu près au trentième jour. A ce moment, le liquide résiduel sous-jacent est limpide, jaune ambré, avec dépôt.

Actinomyces bovis. — Au vingtième jour après l'ensemencement, le coagulum apparaît ; il est comme dans les cas précédents, fort peu consistant, et soumis à une redissolution graduelle. La croissance du champignon s'effectue assez lentement. La culture consiste d'abord en petites colonies punctiformes grisâtres, bordées de jaune ; ces petites masses finissent par confluer, et la culture présente un aspect bosselé, jaunâtre. La liquéfaction du coagulum semble assez longue, peut-être même en raison de la lenteur de la végétation ; elle n'est achevée qu'au quarante-cinquième jour environ.

La présure et la caséase sont donc indistinctement sécrétées par toutes les espèces cryptogamiques précitées, en végétation sur le lait : leur facile développement sur ce milieu en est d'ailleurs un parfait indice.

Mais, il est difficile dans ces conditions, sinon impossible, de préjuger de la quantité ou de l'activité respectives des deux diastases, présure et caséase, sécrétées par une espèce donnée. On ne saurait faire la part exacte de ce qui revient à chacune d'elles ; car ce que l'on observe est une résultante de leurs deux actions combinées. Les deux

diastases étant antagonistes, leurs effets se masquent mutuellement. Pour cette raison, la coagulation par la présure n'a pas ici la netteté qu'elle aurait en l'absence de caséase, car cette dernière neutralise à un moment donné, l'action présurante et finit toujours par l'emporter sur elle. Tout cela contribue à donner à l'ensemble du phénomène observé une certaine ambiguïté. Une coagulation lente n'aboutissant qu'à un coagulum mou, diffluent, ne doit pas être considérée comme l'indice d'une faible teneur en présure; elle indique seulement que la caséase est en bien plus grande abondance que la présure. On pourrait même noter une absence totale de coagulation sans être en mesure pour celà de conclure à l'absence de diastase présurante.

Les résultats que j'ai obtenus avec quelques champignons parasites, permettent néanmoins de voir qu'ils sécrètent en présence du lait, une présure très active, et en même temps, une caséase dont l'intervention s'oppose nettement à la constitution d'un coagulum ferme et permanent.

Indépendamment de ces modifications d'ordre physique, j'ai voulu voir aussi, mais sans entrer dans le détail à cause de la complexité de la question, quelles étaient les modifications chimiques éprouvées par la substance albuminoïde du lait à la suite de ces mêmes actions diastasiques. Cette incursion dans le domaine de la chimie, se limite à la constatation de quelques réactions nécessaires pour résoudre le problème que je me propose. Toute investigation approfondie en cette matière est réservée au chimiste, qui seul a qualité pour démêler les réactions si complexes qui se passent dans la dégradation des matières albuminoïdes.

Pour faciliter l'exposition et la compréhension de ce qui suit, il m'a paru nécessaire d'exposer brièvement ce que l'on sait actuellement des matières azotées qui entrent dans la constitution du lait, et des enzymes aptes à les modifier. La question a donné lieu à de savantes controverses ; je signalerai particulièrement, les travaux d'Arthus et Pagès (1), ceux d'Hammarsten (2), qui ont mis en lumière les phénomènes de la digestion du lait par les diastases ; et surtout ceux de Duclaux dont les travaux font encore autorité, et paraissent rallier l'opinion de la plupart des savants.

Les discussions scientifiques ont surtout porté sur le nombre et l'appellation des substances albuminoïdes renfermées dans le lait. Pour les uns, il y en avait deux : (caséine et albumine) ; pour d'autres, trois :

(1) Arthus et Pagès : *Recherches sur l'action du lab et la coagulation du lait.* Arch. de physiologie, t. II, p. 331, 1890. *Recherches sur le lab-ferment de la digestion du lait.* Id. p. 450.

(2) Hammarsten : *Milchzeitung*, 1875, et Zeit. physiolog. Chemie, XXII, S, 103.

(caséine, albumine, lactoprotéine) ; enfin, certains voulaient qu'il y en eut six ou huit.

Duclaux (1) démontre à son tour, en s'appuyant sur des faits précis, que le lait normal ne renferme qu'une seule et même substance albuminoïde, la caséine. L'albumine du lait de certains auteurs ; sa lactoprotéine, (Millon et Commailles) ou protéine du petit lait, (Hammarsten) ou encore peptones, (Kirchner) ne sont qu'une seule et même substance à des degrés divers de solution ; *la caséine.*

Pour Duclaux, la caséine existe dans le lait sous trois modifications différentes : solide, colloïdale et dissoute. Ces trois modifications constituent un système en équilibre stable, que peuvent modifier différents facteurs tels que : température, acidité ou alcalinité, diastases etc....

Le lait normal renferme sa plus grande quantité de caséine à l'état colloïdal ; or, en cet état, les molécules de caséine ont à peu près les mêmes affinités, le même degré d'adhésion entre elles, qu'avec les molécules du solvant. Il suffira donc d'un assez faible effort pour modifier cet état d'équilibre, et le déplacer en faveur de la forme solide ou de la forme dissoute.

C'est ce dont sont capables la présure et la caséase.

La présure aurait pour effet, non de toucher aux molécules mêmes, mais de diminuer l'espace intermoléculaire et d'augmenter l'adhésion des molécules entre elles. L'action de la caséase, inversement, diminuerait cette adhérence et augmenterait celle des molécules de caséine avec les molécules du solvant. De sorte que, en résumé, la présure agit au profit de la forme solide, et la caséase au profit de la forme dissoute. Mais les actions se contrariant mutuellement, et la caséase l'emportant en définitive sur la présure, la réaction globale marche vers une redissolution de la caséine, c'est-à-dire, vers le système le plus stable dans les conditions de l'expérience. Il se produit un nouvel état d'équilibre.

Il ne faut donc voir, somme toute, dans les changements d'ordre physique du lait sous l'action de la présure « que les effets des variations produits dans le jeu des adhésions moléculaires (2). »

Mais, si là se borne l'action de la présure ainsi qu'on l'admet aujourd'hui, on ne sait pas au juste le rôle qu'il convient d'attribuer à la caséase.

Est-ce là une diastase bien spécifique, ayant son individualité

(1) Duclaux : *Le lait.* Paris, 1894. Baillière.
(2) Duclaux : *Loc. cit.*

propre ? ou bien est-elle identique à ses congénères qui liquéfient l'albumine et la gélatine ? D'autre part, est-ce une diastase simple ? ou bien représente-t-elle un complexe de diastases qui se partagent le mécanisme physico-chimique de la dislocation du coagulum de caséine, que la présure a formé sans intervenir chimiquement. ?

Duclaux ne pense pas que la caséase soit l'agent unique du procès si complexe de digestion, auquel la caséine est soumise en présence des microorganismes qui s'en nourrissent. Il admet que la caséase ne fait que liquéfier la caséine en la transformant en une substance présentant les réactions confuses des peptones ; et, que les transformations ultérieures de la caséine sont dues à d'autres diastases associées à la caséase. Sur ce point, je ne saurais mieux faire que de citer les propres phrases du savant auteur, qui sont d'une clarté remarquable, à laquelle je ne saurais prétendre dans un sujet aussi sévère :

« ... La caséase se borne à rendre, nous ne savons par quel mécanisme, la caséine soluble et assimilable. Elle ne la peptonise même pas, en employant ce mot dans le sens mal défini qu'il a aujourd'hui ; à plus forte raison, elle est incapable de pousser la destruction plus loin et de donner leucine, tyrosine, urée, acide carbonique, hydrogène. Tous ces résidus variés sont des produits de la vie et de la nutrition des microbes qui ont fourni la caséase, mais non de la caséase ellle-même.... » (1)

« ... Si nous voyons bien qu'il s'agit d'une action diastasique, nous ne savons pas s'il n'y en a qu'une ou plusieurs superposées. La question présente une certaine importance, car si elle était élucidée, elle conduirait à assimiler ou à séparer la caséase, la trypsine, la diastase qui liquéfie la gélatine, et un certain nombre d'autres diastases moins connues, disloquant plus ou moins profondément les matières albuminoïdes. Il est probable que la fibrine, la caséine, l'albumine coagulée ont chacune leur diastase décoagulante, distincte comme leur diastase coagulante. Puis, il est possible qu'amenées à l'état de peptones, elles soient toutes tributaires d'une même diastase tryptique qui les disloque, mais cela n'est pas démontré (2). »

Telle est, en cette partie de mon étude sur les sécrétions diastasiques protéolytiques, l'importante question qui se pose et à laquelle j'essaierai d'apporter quelque contribution.

(1) Duclaux : *Loc. cit.*, Principes de laiterie, 1892, Paris. Le Lait, 1894. Paris.

(2) Duclaux : *Loc. cit.*, Traité de Microbiologie, 1899 t. II. p. 618.

Dans les expériences qui viennent d'être rapportées plus haut, lorsque, dans le cours de la redissolution du coagulum formé par la présure on filtre le lait en voie de digestion, il passe un liquide louche, duquel l'acide trichloroacétique précipite une certaine quantité de caséine. (1) Il suffit d'une nouvelle filtration pour séparer le précipité ; le liquide passe alors limpide, sans être troublé par un excès d'acide. Mais, en revanche, il précipite abondamment par le réactif de Tanret, par une solution de tannin, et fournit à la réaction dite du biuret une coloration pourpre, analogue à celle que donnent les peptones.

A cette substance, donnant ainsi les réactions des peptones, Duclaux a donné le nom de *caséone* pour rappeler sa parenté avec la caséine et avec les peptones ; car il n'admet pas que la caséine ainsi modifiée soit devenue une peptone. Elle représente l'état assimilable de la caséine, son premier pas dans la voie de conversion en peptones. « Nous sommes, dit-il, si ignorants au sujet de la structure et de la propriété de la caséine initiale que nous ne pouvons suivre la façon dont l'édifice primitif se démantelle, ni dire quels sont les premiers produits de la destruction, ils sont trop compliqués. Ce n'est rien de dire que tout commence par la formation des peptones puisque nous ne savons pas ce que c'est qu'une peptone. » (2)

Rien n'autorise en effet, à identifier les peptones provenant de substances albuminoïdes différentes ; et c'est même là, ce qui empêche de se prononcer définitivement sur l'identité ou l'individualité des diastases digestives qui engendrent des substances à réaction de peptones.

Mais, sans vouloir l'identifier aux peptones dont on ignore la constitution chimique exacte, on peut appeler *caséone* la substance qui, dérivant de la caséine, n'en a plus les réactions essentielles, mais présente au contraire celles des peptones. Ce terme de caséone, souvent employé ici, aura donc une signification bien définie.

Cela étant établi, les observations que j'ai poursuivies sur le liquide résiduel provenant de la digestion de la caséine par les Mucédinées en expérience, m'ont permis de constater une dislocation plus profonde encore, de cette substance albuminoïde.

En répétant avec une culture de deux mois environ, les réactions indiquées précédemment, j'ai remarqué que le liquide filtré ne précipite nullement ni par l'acide trichloroacétique, ni par le réactif de Tanret, ni par le tannin.

(1) Cette caséine est un reste de caséine colloïdale ; parce que la réaction, limitée comme la plupart des réactions diastasiques, n'a pu en opérer la transformation intégrale.

(2) Duclaux : *loc. cit*, — Principes de laiterie. — p. 73.

Il possède alors une forte réaction alcaline, et renferme une assez grande proportion de principes ammoniacaux fixes et volatils, ainsi que des produits de destruction avancée de la molécule albuminoïde, urée, leucine, tyrosine, etc...

La caséine n'y est plus décelable, même sous la forme de caséone ; elle a subi une dégradation plus profonde encore. Cette dégradation ultime, est-elle ainsi que le pense Duclaux, le fait de quelque diastase tryptique qui complèterait l'action de la caséase ?

Mais, pour mieux faire ressortir l'unité de ce travail dont les différents paragraphes s'enchainent étroitement ; il me paraît indispensable de donner quelque développement à la question que je viens de poser.

Si nous sommes ici en présence d'une caséase incapable à elle seule d'effectuer tout le cycle des réactions complexes que l'on vient d'entrevoir, il reste à déterminer la diastase ou les diastases qui pourraient lui être associées pour achever l'œuvre de destruction qu'elle a ébauchée. Il se pourrait que ce fut la trypsine elle-même qui, comme on le sait, donne naissance à des termes très simples dans ses digestions. La recherche de la trypsine m'était donc indiquée.

D'autre part, l'absence de trypsine, ou bien sa présence conjointement avec celle de la caséase, constitue un fait, gros de déductions ; car il conduit inévitablement à examiner la question individualité ou identité des deux diastases.

En effet, si la diastase qui peptonise ici la caséine, peptonise également l'albumine, on pourra tout au moins en conclure que de la trypsine est associée à la caséase ; ou que peut-être, les deux diastases sont identiques. Si au contraire, la caséase est dénuée de pouvoir trypsique, on en conclura qu'elle n'est pas associée à la trypsine et qu'elle a une individualité propre, puisqu'elle ne peut se substituer à cette dernière dans les mêmes conditions.

Ces quelques considérations me semblent nécessaires pour faciliter l'interprétation des faits qui suivent ; heureux si je puis échapper au reproche facile à mériter de n'avoir pas éclairci suffisamment un sujet complexe et délicat.

---

§ 2. DIGESTIONS DE LA FIBRINE ET DE L'OVALBUMINE COAGULÉE

Comme pour la recherche de la présure et de la caséase, j'ai directement soumis à l'activité vitale des champignons, une substance nutritive dont la nature albuminoïde, convenablement choisie, nécessite

l'intervention de l'enzyme cherché ; c'était, soit la fibrine, soit l'albumine. Suivant la réaction du milieu, deux diastases peuvent agir, la pepsine ou la trypsine.

Mes expériences ont été conduites de la façon suivante :

Dans des matras à fond plat, sont déposés quelques flocons de fibrine fraîche et bien lavée, puis un peu de bouillon légèrement peptonisé ; le tout est stérilisé à 110 . Les matras d'une première série d'expériences sont amenés à une acidité de 3 p. 1000 en HCl ; ceux d'une autre série sont amenés à une alcalinité de 3 p. 1000 en CO^3Na^2 ; puis, chaque matras est ensemencé et déposé dans l'étuve à 28°.

Les six espèces de champignon décrites dans le premier chapitre ont été soumises à cet essai ; ce sont désormais les seules qui serviront dans les expériences ultérieures.

J'ai constaté qu'en milieu nutritif acide, ces champignons ne tardent pas, au cours de leur végétation, à neutraliser l'acidité ambiante et à rendre le milieu alcalin. Si une digestion de l'albumine a lieu dans ces conditions, elle ne saura être imputable qu'à une diastase trypsique, la pepsine n'opérant qu'en milieu acide. Ce fait est d'ailleurs général, car jusqu'ici, l'on ne connaît pas de microbes producteurs de pepsine, du moins à l'extérieur. Ils accomplissent leurs fonctions digestives en milieu neutre ou alcalin, et quand le milieu ne possède pas cette réaction, ils ne tardent pas à la lui donner par leur processus biologique.

Les champignons parasites, étudiés ici, ne semblent donc pas faire exception à la règle. Dans ces conditions bien déterminées de milieu, j'ai noté un pouvoir albuminolytique nettement accusé pour certaines espèces ; nul, ou à peu près, pour d'autres. La désagrégation de la fibrine et la production de peptones sont particulièrement nettes avec *Aspergillus fumigatus*, *Trichophyton gypseum*, *Achorion Shœnleini* et *Microsporum canis*. Seuls, *Rhizopus equinus* et *Rhizomucor parasiticus*, deux Mucorinées, bien qu'ayant végété à peu près normalement, n'ont pas montré de digestion appréciable. En présence de faits aussi dissemblables, j'ai tenu à renouveler l'expérience et à la conduire sous une autre forme. Les mêmes espèces parasites ont été, cette fois, cultivées sur un milieu reconnu propre à leur donner un développement optimum, et constitué à cet effet par 3 p. 100 de glucose avec 1 p. 100 de peptone Chassaing. Au fond de chaque matras, j'ai placé avant l'ensemencement, de petits cylindres de verre, de 3 c/m de longueur sur 3 m/m de diamètre intérieur, contenant de l'ovalbumine coagulée ; c'est la méthode des tubes de Mette.

Dans ces conditions de pureté absolue, et d'alcalinité assurée par avance, la diastase trypsique exerce son action avec facilité; et cette action se traduit par une désagrégation du cylindre d'albumine qui se creuse à ses deux extrémités. Cette méthode permet même un certain degré de comparaison entre deux pouvoirs albuminolytiques différents. Voici les résultats que cette méthode m'a donnés ; ils confirment les précédents.

Aspergillus fumigatus. — Après 20 jours d'exposition à l'étuve à 28°, le tube d'albumine accuse une digestion de 10mm à chaque extrémité ; au bout d'un mois et demi, le tube est complètement vide.

Trichophyton gypseum. — Au bout du 30e jour il y a 7 à 8m/m d'albumine digérés aux deux extrémités du tube de Mette ; au bout de 40 jours, 10m/m.

Achorion Shœnleini et *Microsporum canis.* — Au bout de 30 jours, 7mm de digestion à chaque extrémité ; 12mm au bout de 40 jours.

Rhizopus equinus. — Au 20e jour, aucune trace de digestion n'est apparente ; au 30e jour et les jours suivants, l'on ne peut constater qu'une très légère excavation aux deux extrémités du tube d'albumine.

Rhizomucor parasiticus. — Aucune désagrégation de la fibrine n'est appréciable après 40 et même 50 jours ; le cylindre d'albumine reste absolument intact ; la réaction est néanmoins fortement alcaline. Ce dernier fait est resté constant en des expériences plusieurs fois renouvelées.

D'autre part, je me suis assuré que les digestions obtenues dans les autres cas, n'étaient nullement le fait des principes entrant dans la composition du bouillon de culture ; car des tubes d'albumine, identiques aux premiers et servant de témoins, n'ont jamais subi la moindre altération au sein des mêmes bouillons non ensemencés et placés à la même température.

La substitution de la glycérine au glucose, dans le bouillon de culture m'a conduit à l'observation d'une particularité intéressante. Dans ce cas, les résultats concernant la digestion trypsique restent sensiblement les mêmes pour chaque espèce, sauf pour le *Rhizopus equinus.* Cette Mucorinée se conduit alors de tout autre façon que dans l'expérience précédente ; elle accuse maintenant un pouvoir albuminolytique considérable. C'est ainsi que le contenu d'un tube de Mette, de même provenance que les autres, disparait, entièrement digéré, après 22 jours d'exposition à l'étuve à 30°. La digestion se manifeste déjà au sixième jour qui suit l'ensemencement, par une disparition notable d'albumine aux deux terminaisons du tube de verre ; elle

progresse rapidement, et au vingt-deuxième jour, il ne reste plus au fond du matras que le tube vide entouré de quelques minimes débris d'albumine, brunis sur toutes les faces.

La fibrine substituée au tube de Mette est aussi très rapidement digérée dans ces conditions.

Ne fallait-il pas, en cette expérience, incriminer la glycérine elle-même ? Je me suis assuré qu'il n'en était rien ; car un tube de Mette reste parfaitement indemne au sein du bouillon glycériné non ensemencé, dans l'étuve à 30°. D'ailleurs, cette éventualité ne s'étant pas manifestée avec le *Rhizomucor parasiticus*, qui continue, dans ces conditions à ne pas produire de trypsine, toute idée d'intervention de la glycérine doit être écartée.

Je dois dire que ces expériences, recommencées un nombre considérable de fois, m'ont présenté cette intéressante variation d'une façon constante. Il y a donc là, entre deux genres cependant assez voisins, une différence physiologique bien nette qui pourra dans certains cas, faciliter les déterminations, et qui constitue en même temps, un nouvel exemple de l'influence que peut exercer la composition du milieu nutritif sur les sécrétions diastasiques.

---

§ 3. LIQUÉFACTION DE LA GÉLATINE.

L'étude de la caséinolyse et de l'albuminolyse, entraînait celle de la gélatinolyse. Ces trois phénomènes diastasiques sont entièrement liés l'un à l'autre par la raison même que l'on ne sait pas encore bien si l'on doit les distinguer ou les confondre.

Souvent, ils ont été confondus en un seul, désigné sous le nom de *protéolyse* ; et le système de diastases capable de transformer les substances albuminoïdes complexes et variées prend dans ce cas, le nom de *protéase*. C'est ainsi que Malfitano (1) en 1900, désigne la diastase ou le complexe diastasique qui s'attaque aux substances protéiques, disant que ces substances ne sont pas encore assez bien définies pour qu'on puisse spécialiser leurs diastases comme on avait commencé à le faire pour les sucres.

Il étudie, dans ce genre d'idée, l'action de la protéase de l'*Aspergillus niger* sur trois principales substances protéiques : la gélatine, l'albumine, la caséine.

(1) MALFITANO : *La protéolyse chez l'Aspergillus niger*. Ann. Instit. Pasteur, t. XIV, p. 60, 1900.
d° : *Sur la protéase de l'Asp. niger*. — Ann. Instit. Pasteur, t. XIV, p. 420, 1900.

Aujourd'hui, à la suite de faits nouveaux, on a commencé à faire des études plus morcelées de cette action diastasique ; on a pris l'habitude de ne plus la considérer comme une, et de la dissocier. Mais encore, faut-il s'appliquer à montrer que cette dissociation de la protéolyse en trois actions diastasiques distinctes n'est pas purement hypothétique, et qu'elle répond à la réalité des faits. C'est ce que j'ai essayé de faire, et c'est pourquoi la gélatinolyse a ici un chapitre spécial, non le moins important.

J'ai pensé qu'en reprenant l'étude de la gélatinase chez les champignons parasites, je serais conduit à des observations qui, ajoutées aux premières, conduiraient à des déductions d'un certain intérêt.

La diastase qui liquifie la gélatine est très répandue dans le monde microbien ; il suffit en effet de laisser exposée à l'air une petite masse de gélatine en gelée pour la voir en peu de temps se peupler de colonies bactériennes et de moisissures qui y font naître des zônes de liquéfaction ; c'est même là, un caractère biologique assez précieux pour la détermination de quelques espèces.

On a voulu quelquefois identifier la gélatinase avec la caséase, ou même avec la trypsine, en se basant sur ce fait que l'on trouve fréquemment deux de ces diastases associées ; mais, comme je l'ai dit, l'argument n'est pas suffisant pour tabler sur leur identité ; et il y a un profond intérêt à essayer d'éclaircir ces connaissances peu précises encore.

Un assez grand nombre de champignons inférieurs liquéfient la gélatine. Quelques expériences exposées ci-après m'ont montré que les champignons pathogènes, objets de cette étude, partagent cette propriété, mais avec des variations considérables suivant les espèces. La constatation chez eux, d'un pouvoir gélatinolytique est des plus simples. Les champignons sont ensemencés sur gélatine ; ils ont ainsi, comme dans les cas précédents, la substance à transformer soumise directement à leur activité.

Une solution de gélatine à 12 p. 100, clarifiée puis amenée à neutralité est répartie au fond de petits matras, de façon à y former une couche solide de 1 cm. d'épaisseur environ. Le tout est stérilisé à 110°; puis, chaque matras est ensemencé avec les six espèces de champignons nommés plus haut. Les cultures sont mises à l'étuve à 23° ; A cette température, un matras témoin non ensemencé, reste indéfiniment solide ; la température ne peut donc, en aucune façon être rendue responsable des liquéfactions qui surviendront dans les matras ensemencés.

Il est assez remarquable de voir que, *dès le lendemain de l'ensemencement*, il existe dans les matras à *Trichophyton*, *Achorion* et *Microsporum*, une zone de gélatine liquéfiée autour du point d'ensemencement.

Au bout du cinquième jour, *Trichophyton* et *Achorion* forment une masse centrale de 8 m/m environ de diamètre. Autour de ce mycélium, la zone de liquéfaction atteint déjà un diamètre de 2 centimètres. *Microporum canis* révèle une puissance gélatinolytique bien supérieure encore. Au cinquième jour, la culture forme, au centre du substratum nutritif, une petite éminence de 2 à 3 m/m seulement de diamètre ; elle est déjà entourée d'une zone concentrique de gélatine liquéfiée de deux centimètres de diamètre. Très rapidement, comme on s'en doute, la liquéfaction est totale ; et la végétation se poursuit avec les caractères habituels de chaque espèce.

L'*Aspergillus fumigatus* se comporte un peu différemment des espèces précédentes. Le mycélium gazonnant envahit assez promptement toute la surface de la gélatine ; il y forme une couche un peu irrégulière en épaisseur. La gélatine sous-jacente se ramollit graduellement, et uniformément puisque le mycélium est en contact avec elle par tous ses points. Au cinquième jour, la sécrétion de gélatinase n'est cependant pas encore assez abondante pour que la liquéfaction du disque gélatineux soit parfaite. Ce n'est qu'au dixième jour que j'ai pu l'observer nettement.

Rhizopus equinus développe lentement ses hyphes lâches, cotonneuses et blanchâtres ; il forme au 5e jour une surface gazonnante de deux centimètres d'épaisseur environ, recouvrant entièrement la gélatine sous-jacente sans que celle-ci présente le moindre indice de ramollissement ; la liquéfaction n'est apparue que vers le 18e jour. Avec le *Rhizomucor parasiticus*, la liquéfaction de la gélatine est aussi lente à se produire. Le pouvoir gélatinolytique de ces deux dernières espèces est donc excessivement faible, surtout si on le compare à celui du *Microsporum canis*.

D'aprés leur aptitude à liquéfier la gélatine, on peut faire deux parts des six champignons étudiés ici. L'une comprend des espèces qui liquéfient très rapidement la gélatine ; elles ont un mycélium compact, blanchâtre. (*Trichophyton*, *Achorion*, *Microsporum*). L'autre comprend des espèces qui liquéfient lentement, et assez difficilement la gélatine ; ce sont des espèces à mycélium lâche, gazonnant et de couleur sombre (*Aspergillus*, *Rhizomucor*, *Rhizopus*).

Dans ce chapitre se trouvent réunies, à la suite d'une première série

d'expériences, quelques observations dont le seul objet est de montrer comment se comporte un groupe de champignons, vis-à-vis de quelques substances albuminoïdes offertes à leur nutrition. Mais parmi elles, il est un point qui attire plus particulièrement l'attention. C'est que, deux espèces, *(Rhizopus equinus, Rhizomucor parasiticus)* qui dissolvaient et dégradaient avec facilité la caséine, se sont montrées à peu près dépourvues d'action sur l'albumine et la gélatine. Or, cette absence de pouvoir albuminolytique et cette faculté de ne dévoiler qu'une très faible activité gélatinolytique en présence des substances les plus aptes à favoriser la sécrétion des diastases correspondantes, tendent à prouver déjà, que la caséase produite par les deux Mucorinées existe chez elles, indépendamment de la trypsine et de la gélatinase, et que, par suite, elle est susceptible d'avoir une individualité propre.

Mais, ces résultats ne permettent pas de refuser d'une façon définitive des pouvoirs albuminolytique et gélatinolytique aux deux espèces en question, ou même de ne les leur accorder que dans de faibles proportions. Il se peut que dans d'autres conditions de milieu, les trois diastases apparaissent simultanément et avec des activités sensiblement équivalentes. L'absence d'une diastase ici, n'a rien d'absolu ; nous ne décelons que les diastases qui ont diffusé dans le milieu ambiant, à la faveur d'un aliment donné. Cet aliment peut favoriser l'élaboration de telle diastase au détriment de telle autre ; et l'on ne saurait en déduire l'impossibilité pour le végétal, de sécréter cette autre, lorsque les conditions de nutrition seront changées.

Les cultures sur lait ne nous ont donné que des renseignements relatifs à la caséase ; de même, l'albumine ne nous a renseigné que sur la trypsine ; la gélatine, sur la gélatinase. Les trois diastases protéolytiques pourraient être sécrétées simultanément, soit sur lait, soit sur albumine, soit sur gélatine sans qu'on puisse en être averti par la simple constatation d'une digestion, puisque chacune des substances protéiques ne nous renseigne que sur la présence d'une seule diastase ; celle dont elle constitue en somme le réactif spécifique.

De là, la nécessité d opérer avec un milieu de composition uniforme, si l'on a en vue de rechercher la simultanéité possible d'existence des trois diastases : caséase, trypsine et gé atinase.

Or, on ne peut songer à cultiver les champignons sur un milieu nutritif constitué à la fois par de la caséine, de l'albumine et de la gélatine, pour déceler une triple action digestive. L'expérience serait délicate à réaliser et se prêterait mal à l'étude des produits de transfor-

mation qui reviennent à chacune des diastases. Mais, il est possible d'adopter un liquide nutritif de composition identique pour chaque champignon, et qui leur assure en même temps un développement facile. Au terme de la végétation, ce liquide renfermera toutes les diastases que les champignons y auront sécrétées, et il sera essayé alors, à un triple point de vue diastasique, sur de la caséine sur de l'albumine, et sur de la gélatine.

Qu'un tel liquide ne soit pas capable de solubiliser à la fois, la caséine, l'albumine et la gélatine, ou même, qu'il présente dans la réalisation respective de ces trois opérations, une *disproportion marquée, évidente ;* il y aura lieu de le noter avec soin, car ces faits constitueront un argument solide en faveur de la non identification des diastases en question.

CHAPITRE III

Pouvoirs protéolytiques des liquides de culture. Diastases protéolytiques.

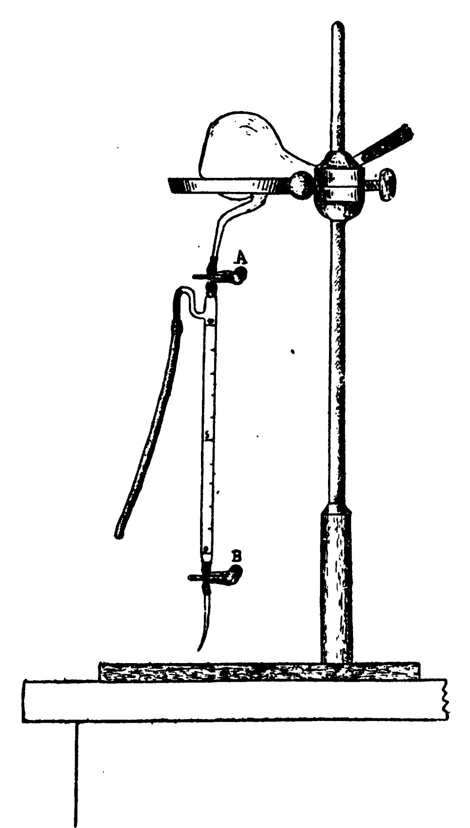
§ 1. TECHNIQUE.

Il m'apparaît comme de toute importance, au début de ce chapitre, de dire quelques mots de la technique un peu spéciale que j'ai dû employer dans la conduite de cette seconde série d'expériences. Il était nécessaire d'opérer purement afin de se mettre à l'abri des contaminations dont les effets, en favorisant ou en contrariant ceux que l'on attend, entachent les résultats d'erreur. Dans ce but, je me suis entouré de toutes les précautions habituelles usitées en bactériologie. Les procédés d'ensemencements stériles, de cultures pures, etc. ont été mis en pratique avec une grande rigueur.

Lorsque les cultures sont arrivées à leur complet développement, et que les matériaux destinés à leur nutrition sont entièrement consommés, les liquides de culture sont filtrés à la bougie Berkefeld stérile ; puis répartis dans les vases (matras, ballons, tubes à essai) où l'on veut étudier leur action sur des substances déterminées. Ces substances sont elles-mêmes stérilisées, soit par la chaleur, soit par l'emploi d'antiseptiques lorsque la stérilisation par la chaleur est impossible.

La répartition du liquide diastasifère est une opération délicate, car elle-même doit être faite stérilement. Pour cela, j'ai imaginé le dispositif ci-contre. C'est un appareil de construction assez simple, qui permet d'introduire, sans opérations longues et compliquées, les filtrats de culture dans les matras ou autres vases destinés à les recevoir. La pratique des pipettes graduées stériles, est ici d'application difficile, et même à rejeter, à cause des prélèvements nombreux et répétés que l'on est obligé de faire, et qui sont autant de causes de contaminations.

L'appareil consiste en un matras Pasteur, de 200 ^{cc} environ, auquel est adapté, par l'intermédiaire d'un raccord en caoutchouc ligaturé à ses extrémités, un tube gradué d'une dizaine de cent. cubes. A la partie supérieure de ce tube gradué, est soudé sur le côté, un tube recourbé bourré de coton, et destiné à assurer la rentrée de l'air pour rendre possible l'écoulement du contenu de la pipette une fois la communication interrompue avec le réservoir supérieur. L'air qui rentre dans l'appareil est ainsi stérile. Un tube effilé fermé à la lampe, est adapté par un raccord en caoutchouc à la partie inférieure du tube gradué; il est destiné à être introduit dans l'ouverture des vases où le filtrat doit s'écouler. Une pince de Mohr, placée sur chaque raccord en A et en B, sert à régler l'écoulement du liquide, soit du réservoir dans la pipette, soit de la pipette dans les matras.



L'entrée libre du matras Pasteur est obturée par un tampon de coton et ne laisse rentrer qu'un air stérile.

L'appareil forme ainsi un tout qui peut être aisément stérilisé à l'autoclave et qui devient alors prêt à recevoir le filtrat au sortir de la bougie.

Le fonctionnement de l'appareil est des plus simples.

Une fois rempli, il est placé sur un support. On appuie sur la pince A, la pipette se remplit d'elle-même entièrement; on ferme alors A, et l'on ouvre B, pour que le tube effilé dont on brise la pointe, se remplisse également. On peut alors laisser l'écoulement se poursuivre jusqu'à ce que le niveau du liquide dans la pipette soit en regard de la division voulue. On introduit maintenant, après l'avoir flambée, la pointe effilée de la pipette dans l'ouverture du vase qui doit recevoir un volume déterminé de la solution diastasifère ; puis, en ouvrant et fermant B, on laisse échapper

le liquide, dont on règle l'écoulement en suivant le niveau dans le tube gradué. Dès que ce niveau est arrivé à o, la division inférieure, on ferme B et l'on ouvre A, la pipette se trouve remplie à nouveau.

Pour que l'écoulement soit plus rapide, on peut encore, comme la figure ci-contre le représente, adapter au tube recourbé qui sert à la rentrée de l'air un tube de caoutchouc d'une certaine longueur, qui permet à l'opérateur de produire à son gré une augmentation ou une diminution de pression à l'intérieur de la pipette, et de faciliter ainsi l'arrivée du liquide ou son expulsion.

Comme on le voit, le fonctionnement de ce matras-pipette n'offre aucune difficulté, pas plus que sa construction, et il présente l'avantage appréciable de pouvoir introduire une quantité assez considérable de liquide, en une seule fois, ou de la fractionner à son gré.

---

§ 2. CHOIX D'UN MILIEU DE CULTURE.

Il convient de faire choix du milieu de culture le mieux approprié au but proposé. Ce milieu devra donner en un minimum de temps une végétation facile et une culture abondante, afin que la sécrétion des principes diastasiques se fasse vite et bien. Il devra aussi ne plus contenir au moment de l'essai, de produits fournissant des réactions analogues à celles qui serviront à caractériser l'action diastasique. Ainsi, le lait ne m'a pas semblé réunir les conditions exigées, car après avoir servi d'aliment aux microphytes, il renferme des principes albuminoïdes et sucrés qui fausseraient les réactions ultérieures. De plus, c'est un liquide peu maniable, se prêtant mal à des opérations de filtration.

J'ai d'abord essayé deux liquides de composition minérale : le liquide de Cohn et le liquide de Raulin.

Liquide de Cohn. — Ce liquide convient mal aux espèces étudiées. Seul, l'*Aspergillus fumigatus* s'y développe un peu, mais mal ; sa culture au bout d'un mois à 30°, ne consiste qu'en un léger voile poudreux, grisâtre. Les autres espèces ne se développent pas.

Liquide de Raulin. — C'est un liquide de choix pour l'*A. niger*, il convient bien aussi à l'*Asp. fumigatus* probablement à cause de sa parenté avec l'*A. niger.* Le champignon s'y développe avec aisance, prend un aspect blanc grisâtre, puis fumé, comme sur la plupart des milieux usuels ; quelquefois cependant la couleur reste uniformément blanche.

Rhizopus equinus et *Rhizomucor parasiticus* y croissent mal, donnent des cultures souffreteuses, sans vigueur, prenant l'aspect d'un mince voile ; elles n'atteignent au maximum qu'un très faible développement, bien insuffisant pour le but recherché.

Achorion Shœnleini, Trichophyton gypseum et *Microsporum canis* paraissent ne pas trouver sur ce milieu les conditions d'un développement facile et normal. Ils y végètent à peine.

Les milieux faits de substances organiques, dans la proportion de 3 °/₀ d'hydrate de carbone et de 1 °/₀ de matières azotées, sous forme de peptones, m'ont toujours donné des cultures luxuriantes, quelle que soit l'espèce ensemencée. Le maltose, le saccharose, la dextrine, le moût de bière, la glycérine, peuvent être substitués au glucose dans les mêmes proportions. Associées à 1 °/₀ de peptones, chacune de ces substances assure à toutes les espèces étudiées ici, un développement rapide et également vigoureux.

Le glucose, aliment ternaire directement assimilable, m'a semblé le meilleur hydrate de carbone ; la peptone employée est la peptone Chassaing. La composition du milieu nutritif qui m'a servi pour toutes les expériences de ce travail est la suivante :

Eau	100	parties.
Glucose	3	—
Peptone	1	—

C'est le milieu employé avec succès par MM. Sabouraud et Bodin pour cultiver les champignons des teignes.

Les six champignons précédemment décrits, sont mis à cultiver sur ce liquide, au fond de ballons à large surface placés à l'étuve à 28°. Après une période végétative variant de trois semaines à un mois et demi, les liquides sont filtrés à la bougie Berkefeld. Cette opération n'est faite cependant, qu'après m'être assuré de la disparition du glucose et des peptones dans le milieu de culture, précaution indispensable, car le filtrat sera précisément essayé plus tard en vue d'une production de peptones et même de glucose. La disparition de ces substances a lieu plus ou moins rapidement selon les espèces ; particulièrement rapide avec l'*Aspergillus fumigatus* où elle est complète entre le 10ᵉ et le 14ᵉ jour, elle est plus lente pour les autres espèces.

A partir de ce moment les opérations sont conduites aseptiquement comme il est indiqué dans le précédent paragraphe.

Les substances soumises à l'action des filtrats de cultures, pour déceler les diastases protéolytiques qu'ils renferment, sont les suivantes :

1° *Lait*, pour déceler la présence de présure et de caséase.
2° *Fibrine*, ou *albumine*, en milieu alcalin, pour déceler la présence de trypsine.
3° *Gélatine*, pour déceler la présence de gélatinase.

---

§ 3. PRÉSURE.

Cinq tubes à essai, contenant 2^cc de lait bien débarrassé de sa matière grasse par écrémage mécanique, sont stérilisés à 110°.

Dans le 1er A on ajoute 1/4 de ^cc de liquide diastasifère
— 2e B — 1/2 ^cc —
— 3e C — 1 ^cc —
— 4e D — 2 ^cc —
— 5e E — 1 ^cc du même liquide bouilli

De cette façon, l'action présurante de la solution diastasique s'exerce successivement sur 8 fois, 4 fois, 2 fois son volume de lait; puis sur un volume égal.

Voici les résultats obtenus avec les filtrats de culture de chaque espèce :

Aspergillus fumigatus. — Avec le filtrat de culture de ce champignon, les tubes ainsi préparés et laissés à l'étuve à 37° durant 8 heures, ont présenté ce qui suit :

En A, Coagulum très net, mais peu consistant.
— B, Coagulum plus ferme.
— C, Coagulum très net, mais subissant déjà une dissolution.
— D, Absence de coagulation ; le lait présente seulement un léger épaississement.
— E, Absence totale de coagulation et d'épaississement.

Chaque tube a reçu une dose proportionnellement croissante de présure et de caséase. Si, malgré cela, les modifications éprouvées par le lait dans les divers tubes ne sont pas analogues, cela tient :

1° A la dilution qui exerce une influence retardatrice bien connue sur la présure et sur les diastases coagulantes en général.

2° A la quantité croissante de caséase dont le fonctionnement antagoniste masque l'action de la présure, en partie ou complètement.

Dans les tubes A et B, au 8e jour, l'action diastasique aboutit définitivement à une coagulation ; à ce moment, la caséase n'a pas encore changé le sens de la réaction ; mais dans les tubes C et D, son action

contrariante se fait sentir plus rapidement, puisqu'elle s'y trouve en quantité plus considérable. La caséase entraîne le système vers un état plus stable, celui de la caséine en solution.

Rhizopus equinus. — La puissance de coagulation du filtrat de culture de cette espèce est assez considérable pour permettre d'obtenir la coagulation d'un certain volume de lait avec des doses beaucoup plus faibles que précédemment. Ici, j'ai fractionné le filtrat à distribuer, en gouttes ; et chaque tube reçoit ainsi une dose de liquide présurant évaluée en fraction de cent. cubes.

Le tube	1	renferme	5 gouttes du filtrat,	soit	1/10e	de cc
—	2	—	10	—	1/5e	—
—	3	—	15	—	3/10e	—
—	4	—	20	—	2/5e	—
—	5	—	25	—	1/2 cc	
—	6	—	50	—	1 cc	
—	7	—	2 cc	—	2 cc	
—	8	—	3 cc	—	3 cc	
—	9	—	4 cc	—	4 cc	

Il m'a été impossible d'observer le moment précis de la coagulation pour des raisons déjà expliquées ; car le lait passe insensiblement de l'état liquide à l'état de coagulum mou ; il subit un épaississement graduel, sans transition, devient muqueux, puis gélatineux, et se résout de même en un liquide trouble.

Les observations possibles se limitent au suivantes :

Après deux heures d'exposition à 37° les tubes 4, 5, 6 et 7 sont déjà coagulés ; ceux qui les précèdent ou les suivent ne le sont pas encore. Au bout de quatre heures, la coagulation s'accentue dans ces tubes et s'étend à ceux où elle n'existait pas encore. C'est le tube 6 qui présente à ce moment le maximum de coagulation ; il renferme 1cc de filtrat de culture.

Au-dessous de cette dose, la quantité de présure ne peut amener qu'une faible coagulation ; au-dessus, la proportion de caséase s'élève et contrarie l'action présurante, aidée par la grande dilution.

Rhizomucor parasiticus, Trichophyton gypseum, Achorion Shœnleini, Microsporum canis abandonnent également dans le liquide une présure dont l'existence a pu être nettement constatée de la même façon que précédemment.

Tous les filtrats de culture ont ainsi présenté un pouvoir coagulant dont l'intensité ne peut être soumise à aucune mesure absolue,

puisqu'il est constamment associé à un pouvoir décoagulant qui agit dans un sens opposé. On voit en outre, que la présure apparait dans un milieu de culture en l'absence de la substance caséine sur laquelle elle exerce spécialement son action.

---

§ 4. CASÉASE.

Les expériences qui précèdent sont déjà suffisantes pour affirmer que les liquides de culture renferment, outre la présure, une diastase décoagulant le lait que la présure a coagulé : c'est la caséase.

Mais, l'action de la caséase peut être rendue plus nette encore si, à divers moments de son action sur le lait, on dose dans ce dernier la caséine résiduelle. Un dosage pondéral nous renseigne ainsi sur la quantité de caséine disparue, et par suite, sur l'activité de la caséase. Dans ce but, et enfin d'atténuer les erreurs d'expérience, j'ai opéré sur une plus grande quantité de lait.

Les filtrats de culture sont introduits par 5^{cc} dans des matras renfermant déjà 25^{cc} de lait, pur, écrémé et stérile. L'un d'eux, comme toujours il sera fait, est préparé en vue de servir de témoin ; il reçoit du filtrat diastasifère bouilli au B. M. Enfin tous les matras sont placés à l'étuve à 37°.

On observe tout d'abord, sauf dans le matras témoin, une coagulation générale suivie d'une dissolution du coagulum formé. Le lait diminue d'opacité, prend une couleur grisâtre, et finalement, l'aspect d'un bouillon trouble. Ces modifications nous sont déjà connues.

A des intervalles bien déterminés, j'ai recueilli sur un filtre taré, la caséine précipitée par l'acide trichloroacétique. Une pesée à la balance de précision suffit maintenant pour faire connaître le poids de caséine restant. Par différence avec le poids de la caséine précipitée de 25^{cc} du lait normal de même provenance, on a le poids de caséine disparue (1).

(1) Plusieurs procédés de dosage de la caséine ont été indiqués, (Hoppe-Sayler, Millon et Commailles, Patein, Denigés, etc.) et tout récemment l'on vient d'en proposer un nouveau (TRILLAT et SAUTON. *Ann. de l'Instit. Pasteur*, décembre 1906). La méthode que j'ai employée est celle du dosage direct par l'emploi d'un acide qui précipite intégralement la caséine sans la solubiliser notablement. L'acide trichloroacétique présente précisément cet avantage sur l'acide acétique, surtout quand l'opération est conduite rapidement.

Voici quels sont les résultats :

Aspergillus fumigatus. — Liquide de culture de un mois et 10 jours. (Poids de la caséine initiale de 25 ^{cc} de lait normal, 1 gr. 027.)

Durée de l'action diastasique	Caséine restant	Caséine disparue
12 heures	0,966	0,057
1 jour	0,950	0,063
2 —	0,915	0,108
3 —	0,892	0,131

Avec le liquide de culture glycériné peptonisé, les résultats sont un peu différents, le pouvoir caséinolytique semble diminué. (Poids de caséine initiale, 1 gr. 023).

Durée de l'action diastasique	Caséine restant	Caséine disparue
12 heures	0,781	0,246
1 jour	0,740	0,287
2 —	0,671	0,356
3 —	0,582	0,445

Rhizomucor parasiticus. — (Culture de 2 mois) :

Liquide glucosé peptonisé. (Poids de caséine initiale 1,164).

Durée de l'action diastasique	Caséine restant	Caséine disparue
1 jour	0,944	0,220
2 —	0,880	0,284
3 —	0,768	0,396
4 —	0,653	0,511
5 —	0,499	0,663
6 —	0,487	0,677

Liquide glycériné peptonisé. (Même lait initial) :

Durée de l'action diastasique	Caséine restant	Caséine disparue
1 jour	1,01	0.154
2 —	0.944	0,220
3 —	0,897	0,267
4 —	0,862	0,302
5 —	0 849	0,315
6 —	0,828	0,336

La destruction de la caséine par la caséase est ainsi rendue très apparente, et cela d'autant mieux, que le matras qui sert de témoin, donne à la précipitation par l'acide trichloroacétique un poids de caséine très sensiblement voisin de celui que renferme le même volume du lait initial. Les faibles variations que j'ai observées sont dans les limites des erreurs d'expérience.

Les filtrats de culture de *Trichophyton gypseum*, *Achorion Shœnleini* et *Microsporum canis* ont aussi montré un pouvoir caséinolytique sensiblement du même ordre de grandeur que les précédents.

Quant aux transformations chimiques subies par la matière albuminoïde du lait à la suite de cette action diastasique, ellles sont les mêmes dans les grandes lignes, que celles qui se sont produites dans l'action directe des champignons en végétation sur le lait. Elles font d'abord apparaître une série de produits variés, intermédiaires comme constitution, entre la caséine initiale et le terme plus simple caséone. Ces produits constituent un mélange de substances protéiques à des degrés divers de dislocation, substances que l'on ne saurait distinguer les unes des autres avec précision, par des réactions de précipitation. Je les engloberai sous le nom de *caséo-albumoses* ou *caséoses*, par analogie avec les premiers produits de désintégration de l'albumine au cours de la digestion pepsique.

Comme les albumoses, elles précipitent par les acides ; se redissolvent à chaud, pour réapparaître au refroidissement Elles précèdent l'apparition du terme caséo-peptone, et coexistent avec lui. Enfin, la dégradation de la molécule caséine est poussée jusqu'à ses dernières limites; comme j'ai pu en juger par la production d'urée, de tyrosine et de produits ammoniacaux fixes ou volatils.

Mais le phénomène que je voudrais plus spécialement mettre ici en

évidence, est l'importante solubilisation de la caséine par laquelle débute l'action digestive. Et, par *solubilisation* de la caséine, il faut évidemment comprendre la production des nombreux termes échelonnés jusqu'au niveau de la caséone, termes constitués par les caséoses, (protéocaséose, deutérocaséose etc...) qui ne sont en somme que de la caséine initiale solubilisée évoluant vers le terme caséone ; et qui correspondent aux nombreuses dextrines intercalées dans la saccharification de l'amidon, entre l'amidon, terme initial, et le sucre réducteur. Ils représentent si l'on veut, de la caséine à divers degrés de complexité, et en solution ; mais ce n'est pas encore de la caséone.

On peut se demander précisément, si cette solubilisation de la caséine ne constitue pas un acte distinct de celui de peptonisation et nécessitant une diastase différente pour s'effectuer.

En d'autres termes, existe-t-il une seule diastase ou deux, dans la caséase ?

Sans doute, c'est là une question de chimie biologique que je ne saurais avoir la prétention d'élucider ; néanmoins, je voudrais la présenter, et y joindre les observations que j'ai recueillies à ce sujet, ainsi que l'interprétation à laquelle elles me semblent donner lieu.

On a vu que pour Duclaux, la caséase se borne à rendre la caséine soluble et assimilable, en l'amenant à un terme voisin des peptones ou tout au moins comparable. Suivant cette conception, seule, la caséase apparaît pour opérer la transformation.

Mes observations sur les champignons que j'étudie ici, me conduisent à penser que cette transformation doit être le fait de deux diastases distinctes. L'une, agirait physiquement, solubilisant la caséine solide ; l'autre, agirait chimiquement, peptonisant la caséine solubilisée. De cette manière deux stades seraient à distinguer dans la dislocation de la caséine par la caséase.

J'ai remarqué en effet, que la solubilisation de la caséine, et sa peptonisation par les liquides de culture des champignons étudiés, ne semblent pas marcher de pair, comme elles devraient le faire si ces actions étaient dues à une diastase unique. Il n'y a pas simultanéité d'action ; la caséine n'apparaît pas peptonisée au fur et à mesure de sa solubilisation. On ne saurait admettre qu'une seule et même diastase puisse produire successivement, des actions aussi différentes : simple dissolution d'une part ; action chimique d'autre part.

Voici quelques faits qui me permettent d'appuyer mon opinion. Plusieurs matras, renfermant chacun 25^{cc} de lait et 5^{cc} de filtrat de

culture, sont placés à l'étuve à 28°. Jour par jour, j'ai examiné les modifications éprouvées par le lait, en effectuant quelques réactions de précipitation. Ces réactions, ont moins pour but de déterminer la nature chimique exacte des substances qui ont pris naissance, que d'établir une séparation entre deux actions d'ordre différent. Duclaux affirme d'ailleurs avec juste raison, que : « tant que la dislocation de la molécule albuminoïde n'est pas poussée assez loin pour lui enlever la plus grande part de sa complication initiale, nous ne sommes pas en mesure de reconnaître et d'isoler les produits intermédiaires. » Et il déclare imprudent « de se servir pour les distinguer, de réactions de précipitation à l'aide des acides, des bases, et surtout des sels ».

A la fin du premier jour, l'un des matras reçoit 5cc d'acide trichloroacétique ; tout ce qui est caséine se trouve ainsi rassemblé (1). A la filtration au papier, il passe un liquide ne précipitant plus par un excès d'acide, et présentant les réactions des peptones (coloration pourpre à la réaction biurétique, précipitation par le réactif de Tanret, par une solution de tannin).

Mais, dès le deuxième jour, les matras soumis à l'expérience laissent entrevoir une divergence qui s'accentue encore chez les matras des jours suivants ; de sorte qu'au sixième jour par exemple, on peut observer ce qui suit : Cinq cent. cubes d'acide trichloroacétique sont devenus insuffisants pour précipiter intégralement la caséine résiduelle ; car après cette opération, le liquide qui s'échappe du filtre, bien que limpide, renferme encore une assez forte proportion de caséine échappée à la précipitation, que l'on peut précipiter par une nouvelle dose d'acide et séparer par une nouvelle filtration. La séparation effectuée, on remarque comme pour les cas précédents que le filtrat renferme de la caséone.

Ceci conduit à penser qu'il y a eu accumulation de molécules de caséine uniquement solubilisées, attendant l'acte de la peptonisation. Il y a un stade de liquéfaction séparé du stade de peptonisation, par un intervalle où s'échelonne la série des produits intermédiaires déjà cités, dont on retrouve les équivalents dans la transformation des albumines en peptones par la pepsine. C'est sans doute l'accumulation de ces molécules de caséine solubilisées qui nécessite une dose plus considérable de précipitant. Aussi, lorsqu'on ne tient pas compte dans le dosage pondéral de la caséine, de sa difficulté à précipiter intégra-

(1) La dose de 5 cc d'acide trichloroacétique à 30 p. 100 m'a parue amplement suffisante pour précipiter toute la caséine de 25c.c. de lait initial ou de 25c.c. de lait qui a reçu un liquide diastasifere bouilli.

lement lorsque l'action diastasique s'est prolongée, on risque de s'arrêter à un chiffre trop faible.

Quant à la portion de caséine qui constitue le coagulum aggloméré sur le filtre dans l'expérience précédente, elle a acquis une solubilité beaucoup plus grande. Elle abandonne continuellement en effet, aux eaux de lavages, une grande partie de sa substance. Celle-ci, passe en solution ; car des eaux de lavage bien claires, on la reprécipite par l'acide trichloroacétique (1). Je n'ai pu faire pareille constatation avec un coagulum de lait normal ou d'un lait qui a servi à établir une expérience témoin.

L'action de la caséase débute donc bien par un phénomène de solubilisation pure et simple de la caséine, sans que celle-ci atteigne l'organisation du terme peptone.

De ces observations, je dois rapprocher les suivantes, qui conduisent aux mêmes conclusions, et qui ont trait aux modifications digestives éprouvées directement par le lait, sous l'influence du champignon qui y végète. Ces observations sont particulièrement nettes avec le *Streptothrix de Vallée*. Ce champignon solubilise la caséine plutôt qu'il ne la peptonise. Ensemencé sur 75 cc de lait, il y produit d'abord une coagulation, puis redissout peu à peu le coagulum formé. Au bout d'un mois, la dissolution opérée est très accusée; le lait, devenu un bouillon trouble, présente une assez faible opacité indiquant qu'une partie considérable de la caséine est disparue en tant que caséine colloïdale. Si cette caséine dont on constate ainsi la disparition est passée à l'état de caséo-peptone ou caséone, l'acide trichloroacétique n'ayant pour effet que de rassembler la caséine solide résiduelle et la caséine dissoute, ne donnera qu'un précipité peu abondant.

Or, ceci n'a pas lieu. Le réactif en question conduit à un précipité volumineux de caséine ; il se dépose un important coagulum, sorte de fromage, d'autant plus compact et consistant, que le liquide qui le tenait en suspension à l'origine, a diminué de volume par évaporation à l'étuve.

J'ai de cette façon recueilli 2 gr. 763 de caséine précipitée, alors que primitivement les 75 cc de lait en renfermaient 2 gr. 879. La différence, 0 gr. 116 correspond à la caséine disparue transformée en caséone. On voit que cette quantité de caséine peptonisée est faible, comparati-

(1) MM. Trillat et Sauton : (Ann. Inst. Pasteur, nov. 1906) constatent également que la matière albuminoïde d'un lait normal séparée par l'acide trichloroacétique redevient légèrement soluble au lavage. Mais, avec le titre de la solution acide que j'ai employée, je n'ai jamais observé une influence dissolvante comparable à celle des liquides de culture diastasifères.

vement à celle, qui durant le même temps de végétation, n'a été que solubilisée.

Il faut alors admettre que la caséine disparue en tant que caséine colloïdale, existait en majeure partie sous la forme dissoute, dans le bouillon de culture d'un mois ; une faible partie seulement s'y trouvait à l'état de caséone. Le phénomène prédominant a donc été la solubilisation de la caséine ; la légère peptonisation qui s'est accomplie dans le même laps de temps est hors de proportion avec cette solubilisation. Les deux actions, aussi inégales et disproportionnées apparaissent indépendantes, et par suite bien distinctes.

Cette observation vient encore appuyer l'hypothèse de l'existence de deux actions diastasiques dans la transformation de la caséine en caséone. La première, conduisant la caséine solide aux termes caséine soluble et caséoses ; la seconde, commençant à ce stade pour aboutir au terme caséo-peptone.

Si, de cette manière, il me paraît possible de distinguer deux diastases dans la caséase, je dois convenir cependant que la distinction n'est pas assez nette encore, et qu'il est nécessaire d'entreprendre d'autres expériences pour émettre une conclusion définitive sur ce sujet. Néanmoins, ces faits sont de nature à faire entrevoir l'acte de digestion du lait par la caséase des microbes, comme un peu plus complexe qu'il ne semble. Ils viennent s'ajouter à ceux déjà nombreux qui plaident la multiplicité des diastases, plutôt que leur fusionnement.

A ce propos je ne crois point superflu de relever ici, la curieuse analogie qui existerait alors entre les diastases de la caséine et celles de l'amidon.

Suivant Duclaux, l'amidon n'est pas dissous quand il est à l'état d'empois. « Il est à l'état de la caséine dans le lait, en simple suspension, et de très légères influences le coagulent et le précipitent (1) ». Or, la diastase qui coagule l'amidon est connue depuis les travaux de MM. Wolf et Fernbach (2) et ceux de M. Boidin (3) : c'est l'amylo-coagulase, pour laquelle l'amylase constitue une diastase antagoniste, comme la caséase est l'antagoniste de la présure. Il existe ainsi une certaine analogie entre la coagulation du lait par la présure, et celle de l'empois d'amidon par l'amylo-coagulase ; toutes deux précèdent une solubilisation d'éléments primitivement en suspension.

(1) Duclaux : *Loc-cit.*
(2) Wolf et Fernbach : *Sur la coagulation de l'amidon.* — C. R. Ac. d. Sc., t. CXXXVII, 1903.
(3) Boidin : *Contribution à l'étude de l'amylo-coagulase.* — C. R. Ac. d. Sc., t. CXXXVII, p. 1080, 1903.

Mais, le parallélisme peut être conduit plus loin ; surtout si pour cela, on utilise la théorie de la saccharification de l'amidon établie par Duclaux (1). Suivant cette théorie, la diastase du malt ou amylase, qui *liquéfie* et *saccharifie* l'empois d'amidon, résulterait de l'association de deux diastases : l'une, simplement *liquéfiante* ou décoagulante, serait l'amylase proprement dite ; l'autre, *saccharifiante*, transformant chimiquement l'amidon solubilisé, serait la dextrinase.

Duclaux admet que l'action de l'amylase est terminée quand elle a donné la dextrine ; et, d'après lui, cette transformation n'est pas d'ordre chimique ; « c'est seulement une *solubilisation d'éléments primitivement en suspension* ». Au terme dextrine, commence l'action de la dextrinase, action essentiellement chimique, puisqu'elle est hydrolysante.

On voit, que les deux diastases : amylase proprement dite et dextrinase ont leurs équivalents dans la digestion de la caséine par les diastases. Ce sont : d'abord, la caséase proprement dite, dont le rôle indiqué par Duclaux doit être limité à la solubilisation de la caséine ; puis, une diastase peptonisante, agissant probablement aussi par hydrolysation comme la dextrinase, qui conduirait la caséine solubilisée au terme caséone.

En résumé ; dans ce rapprochement, les points de départ et les points d'arrivée sont respectivement comparables. On part d'une matière première en suspension ou plus ou moins cohérente, et on arrive à des mélanges complexes, peut-être mieux connus dans le cas de l'amidon que dans le cas de la caséine. Dans chacun des cas, le chemin parcouru comprend deux étapes.

Le tableau suivant, résume ces considérations d'analogie, et montre en définitive que la caséase définie par Duclaux, devient l'équivalent de la diastase du malt et se dédouble d'une façon identique.

(1) Récemment, une autre théorie de la saccharification de l'amidon par les diastases, appelée sans doute à remplacer celle de Duclaux, a été émise par M. Maquenne (L. Maquenne : *L'amidon et sa saccharification diastasique.* Revue générale des Sciences, 15 octobre 1906).

Se basant sur une connaissance plus approfondie de la constitution de l'amidon, M. Maquenne fait intervenir trois diastases ; le plan de la saccharification devient alors différent. Avec l'imperfection de nos connaissances actuelles sur la constitution de la molécule caséine, je ne puis envisager pour l'instant, un parallélisme avec la remarquable théorie établie par les importants travaux de M. Maquenne. Il faut attendre pour cela, que la caséine soit mieux étudiée : et qu'en outre on retrouve dans sa constitution le même agencement que pour l'amidon.

SACCHARIFICATION DE L'AMIDON		PEPTONISATION DE LA CASÉINE	
Empois d'amidon + *Amylo-coagulase*		Lait + *Présure*	
Coagulum d'amidon + *Amylase ppt dite*	Amylase	Coagulum de caséine + *Caséase ppt dite*	Caséase
Amidon soluble et dextrines + *Dextrinase*		Caséine soluble et caséoses + *Diastase peptonisante*	
Maltose		Caséone	

Cette conception de la dislocation de la caséine par la caséase est très vraisemblable bien qu'encore hypothétique ; car elle n'a pas l'avantage d'être appuyée par des faits expérimentaux aussi décisifs que ceux qui ont permis de distinguer les différentes phases de la saccharification de l'amidon. Néanmoins, les faits que j'ai observés permettent de justifier dans une certaine mesure cette interprétation, et en tout cas peuvent servir à orienter des recherches plus importantes dans cette voie. Il appartient au chimiste de le faire, plutôt qu'au biologiste.

§ 5. TRYPSINE.

J'ai montré précédemment qu'il était utile de savoir si un filtrat de culture renfermant de la caséase contenait en même temps de la trypsine, afin d'envisager les analogies ou les différences que présentent ces deux enzymes, souvent considérés comme identiques. Pour cette recherche, les filtrats de culture sont déposés avec des fragments de fibrine fraîche ou d'ovalbumine coagulée au fond d'un matras ; puis, ce contenu est amené à l'alcalinité nécessaire au fonctionnement de tout ferment trypsique par l'addition de quelques gouttes d'une solution de carbonate de soude.

Là encore, l'asepsie est obtenue par un chauffage à 110° mais cette opération ayant pour effet de rendre la fibrine moins digestible, j'ai établi parallèlement une autre série d'expériences où une asepsie moins rigoureuse, mais suffisante cependant, était obtenue en adjoignant au milieu un cristal de thymol.

Dans l'un et l'autre cas, j'ai toujours eu soin d'établir un témoin avec liquide diastasifère bouilli. Chaque matras ainsi préparé reçoit 15 cc du filtrat de culture du champignon à essayer, et est ensuite placé à la température de 37°. Voici les résultats qui se rapportent à chacune des espèces.

Aspergillus fumigatus. — La fibrine cuite est attaquée lentement ; elle se désagrège peu à peu, puis se dissout en partie ; la fibrine fraîche, plus digestible, est entièrement dissoute en moins de 48 heures ; le témoin ne présente au bout de ce temps, qu'une insignifiante désagrégation.

Le tube où s'est effectuée la digestion de fibrine, a son contenu parfaitement limpide ; ce qui exclut toute hypothèse de contamination. La chaleur y fait apparaître un léger précipité dû à de la fibrine solubilisée, mais non entièrement peptonisée. Après séparation de ce précipité, le liquide à nouveau limpide, précipite abondamment par le réactif de Tanret et par une solution de tannin ; il donne la coloration pourpre à la réaction biurétique ; enfin, la tyrosinase, suc du *Russula delica*, préconisée par Harlay (1) dans la recherche des digestions trypsiques, donne une coloration rouge qui noircit peu à peu. Ces réactions, dans leur ensemble, caractérisent la production de peptones par le processus d'une digestion trypsique.

J'ai, d'autre part, pour ces digestions, utilisé l'albumine de l'œuf sous forme de tubes de Mette ; cette méthode, déjà décrite au chapitre précédent, m'a permis de comparer entre eux les pouvoirs albuminolytiques des divers filtrats de culture. Pour l'*Asperg. fumigatus*, les résultats sont les suivants, la température étant de 30° :

DURÉE DE L'ACTION DIASTASIQUE	LONGUEURS EN mm DE L'ALBUMINE DISPARUE A CHAQUE EXTRÉMITÉ DU TUBE DE METTE
1 jour	1/2 mm
2 —	3/4 mm
3 —	1 mm 1/2
6 —	2 mm 1/2

Le témoin, durant ce temps, n'accuse aucune trace de digestion. J'ai constaté que le filtrat glycériné peptonisé et le Raulin accusaient une

(1) HARLAY : *De l'application de la tyrosinase à l'étude des ferments protéolytiques*. Thèse de Doctorat, Paris 1900.

puissance albuminolytique très voisine de celle du filtrat glucosé.

Rhizopus equinus. — La fibrine subit une très minime désagrégation ; lente et peu appréciable. Les tubes de Mette, au bout d'une dizaine de jours, ne présentent aux deux extrémités, qu'une très légère excavation n'atteignant pas 1/2 m/m de profondeur.

Rhizomucor parasiticus. — Après 15 jours, et au-delà, la fibrine cuite n'a éprouvé aucune désagrégation apparente ; la fibrine fraîche est légèrement gonflée ; les tubes d'ovalbumine sont absolument restés intacts après un mois.

Cette dernière espèce est assez digne de remarque, car son liquide de culture, capable de digérer la caséine, se montre dénué de pouvoir albuminolytique, ou tout au moins pourvu d'un pouvoir si faible, qu'il échappe à l'observation.

Tous nos champignons sont au total, de faibles producteurs de trypsine, surtout quand on les compare à certaines bactéries du sol ou de l'air qui ont si vite fait de décomposer les matières organiques azotées.

Ces observations concordent avec celles du chapitre précédent. Ce qu'il importe surtout de retenir ici, c'est que le *Rhizopus equinus* et le *Rhizomucor parasiticus* forment un groupe de champignons remarquables par leur sécrétion insignifiante ou nulle en trypsine, avec un milieu sur lequel ils produisent de la caséase.

Je rappellerai en outre, que dans le chapitre précédent, en envisageant l'hypothèse de Duclaux suivant laquelle la dislocation ultime de la caséine par les microbes pourrait être le fait d'une diastase tryptique, je m'étais posé la question de savoir quelle pourrait être la diastase associée à la caséase pour déterminer la dégradation profonde que subit la caséine sous l'influence directe des champignons parasites et sous l'action de leur liquide de culture. Le moment me semble convenable pour y répondre.

Dans ces cas particuliers présentés par le *Rhizopus equinus* et le *Rhizomucor parasiticus*, il apparaît assez nettement que la diastase en question est différente de la trypsine, puisque le même liquide diastasifère qui disloque profondément la caséine, laisse l'albumine intacte en milieu alcalin.

Quelle serait donc alors cette diastase ? Parmi les solutions qui peuvent se présenter, il en est deux que je me bornerai à proposer, laissant pour un autre moment le soin de leur vérification, afin de ne pas donner à ce travail une trop grande étendue.

Il est possible que la diastase qui intervient à la suite de la caséase pour pousser la destruction de la caséine jusqu'aux termes leucine, tyrosine, produits ammoniacaux, soit la diastase « caséonisante » elle-même que j'ai distinguée précedemment; elle se comporterait ainsi comme une diastase tryptique. Il se pourrait aussi que ce soit une érepsine.

On sait que ce dernier enzyme découvert par Connheim dans la muqueuse intestinale des Mammifères, est incapable de dissoudre l'albumine ou la fibrine, mais transforme les albumoses et les peptones en produits cristallisés très simples, et attaque nettement la caséine du lait. On verra d'autre part, que l'identité de la caséase avec l'érepsine est fort soupçonnée.

---

§ 6. GÉLATINASE.

J'ai recherché aussi quelle était l'activité gélatinolytique des liquides de culture dont je viens d'examiner les pouvoirs caséinolytique et albuminolytique.

Pour cela, une solution de gélatine à 12 p. 100, neutralisée, est répartie par 10^{cc} dans des tubes à essai. Ceux-ci, et leur contenu sont ensuite stérilisés à la température de 110°. Avant que la gélatine ait perdu sa fluidité, et après refroidissement suffisant pour que l'action diastasique ne soit pas entravée, les filtrats de culture sont introduits à l'aide du matras-pipette. Aussitôt qu'après agitation, le mélange est *intimement* opéré, les tubes sont mis à refroidir dans un courant d'eau jusqu'à solidification de la masse gélatineuse, puis, placés définitivement à l'étuve à 22°.

Des tubes témoins, les uns sans filtrat de culture, les autres additionnés de 7 à 8^{cc} d'un liquide actif, préalablement bouilli, ne s'y liquéfient pas à cette température. Cette remarque a son importance, car elle permet d'écarter à la fois l'influence de la température et celle de la dilution dans la liquéfaction d'un tube de gélatine additionné de liquide diastasifère. Les résultats relatifs à chaque espèce cryptogamique sont exposés dans les tableaux ci-dessous ; la puissance de gélatinolyse est mesurée par le temps nécessaire à la liquéfaction complète et parfaite du tube de gélatine.

Aspergillus fumigatus. — Culture de 1 mois et 15 jours.

VOLUME EN CENT. CUBES DE LA SOLUTION DIASTASIFÈRE	TEMPS NÉCESSAIRE POUR OPÉRER LA LIQUÉFACTION	
	Liquide glucosé	*Liquide glycériné*
3 cc	1 h. 1/2	28 heures
2 cc	5 heures	5 jours
1 cc	14 —	8 —
1/2 cc	25 —	14 —

Lorsque des tubes identiquement préparés sont exposés à une température moins élevée (16°), la liquéfaction s'effectue beaucoup plus lentement, ainsi qu'on doit s'y attendre. Les chiffres suivants témoignent de cette lenteur.

1cc de filtrat glucosé produit la liquéfaction en 2 jours.
1cc — glycériné — 12 jours.

Aucun des tubes témoins ne s'est liquéfié. L'échelle de la température, facteur important dans toutes les actions de diastases, intervient ici d'une double façon : car une température peu élevée retarde l'action diastasique en même temps qu'elle rend la gélatine moins liquéfiable.

La gélatine ainsi liquéfiée par la gélatinase a perdu la faculté de se reprendre en gelée, dans les conditions où elle le faisait normalement. Plus on s'éloigne du moment où la liquéfaction s'est produite, et plus on observe de retard à la gélification, et moins la gelée reprend de consistance. Finalement, lorsque l'action diastasique s'est prolongée longtemps, la température du simple courant d'eau devient très insuffisante pour provoquer le retour de la prise en masse. Voici l'explication de ces phénomènes qui me semble la plus rationnelle.

L'action liquéfiante est très certainement doublée d'une action chimique ; ce que l'on vient d'observer est une solubilisation pure et simple, qui donne naissance à des produits complexes encore mal déterminés, et que pour cette raison on rassemble sous le nom de gélatoses, terme équivalent des albumoses et des caséoses, dont la caractéristique est d'avoir perdu la faculté de gélification. L'action chimique se poursuit alors pour aboutir au terme de gélatino-peptone.

On retrouve en somme le schéma de ce qui se passe avec la caséine et l'albumine sous l'action de leurs diastases respectives.

Au fur et à mesure que s'effectue cette transformation chimique de la gélatine, le titre de la solution gélatineuse s'abaisse graduellement, et de ce fait, sa faculté de gélification diminue, de sorte qu'il devient nécessaire de produire de basses températures pour la provoquer.

D'autre part, l'action gélatinolytique engendre aux dépens de la gélatine même, une foule de composés grâce auxquels la solution gélatineuse en expérience doit se comporter finalement comme une solution saline. Sa concentration dépend nécessairement de l'action diastasique qui engendre les produits de destruction de la molécule de gélatine ; elle est d'autant plus élevée que l'action s'est poursuivie plus longtemps ou que le liquide diastasifère a été introduit en quantité plus considérable. Lorsqu'on abaisse suffisamment la température, on finit par être en présence d'une véritable congélation soumise aux mêmes lois que celle de toute solution saline. Le point de congélation s'abaisse à mesure que la concentration augmente. C'est en effet ce que j'ai dû constater.

Le thermomètre renseigne ainsi sur la continuité de l'action digestive qui se poursuit longtemps après la liquéfaction obtenue. A l'aide d'un cryoscope, j'ai noté les températures de la prise en masse de gélatine, aux divers moments de l'action gélatinolytique.

Pour l'*Aspergillus fumigatus*, les résultats sont les suivants :

VOLUME EN C.C. DE LA SOLUTION DIASTASIFÈRE	TEMPS ÉCOULÉ DEPUIS LA LIQUÉFACTION	TEMPÉRATURE DE LA PRISE EN MASSE
1/2 cc	20 heures	+ 5°
1/2 cc	24 —	+ 7°
1 cc	24 —	— 8°
2 cc	24 —	— 13°

J'ai tenté de substituer la gélatine thymolée à la gélatine stérilisée par la chaleur, ce qui dispense alors de toute précaution aseptique dans les opérations. Mais, cette gélatine offre une plus grande résistance à l'action de la gélatinase ; son ramollissement est beaucoup plus lent ; et la méthode ne présente pas ainsi toute la sensibilité désirable dans certains cas.

Une autre méthode m'a servi à déceler le pouvoir gélatinolytique des liquides de culture ; c'est celle des tubes de Mette, modifiée pour

la circonstance. Les petits cylindres de verre sont remplis au moment du besoin, avec une solution de 12 p. 100 de gélatine neutralisée, et colorée par un peu de fuschine. Cette méthode n'est pas sans présenter quelques difficultés d'application. Si elle offre sur la précédente, l'avantage de donner des résultats où la dilution n'a pas exercé d'influence modificative, elle présente par contre l'inconvénient de ne pouvoir être réalisée qu'avec une asepsie restreinte ; car ici, il faut se borner pour opérer purement, à l'emploi d'un cristal de thymol. A la rigueur, lorsque l'action ne doit pas trop se prolonger, les résultats présentent une exactitude suffisante ; mais, si l'action diastasique est lente, ils peuvent être entachés d'erreur par suite de l'ingérence des microbes.

Les tubes de gélatine ainsi préparés sont placés au fond de petits matras, avec 15^{cc} de liquide de culture, et le tout est porté à l'étuve à 22°. Le pouvoir gélatinolytique est mesuré par les longueurs de gélatine disparues aux deux extrémités du tube. En ce qui concerne les filtrats de culture de l'*Aspergillus fumigatus*, les résultats sont les suivants :

DURÉE DE L'ACTION	LONGUEURS DE GÉLATINE DISSOUTE	
	FILTRAT GLUCOSÉ	FILTRAT GLYCÉRINÉ
17 heures	2 m/m	1 m/m 5
24 —	4 m/m	3 m/m
2 jours	6 m/m	4 m/m
3 j. 1/2	9 m/m	7 m/m

Rhizopus equinus. — Cette espèce a été essayée dans les mêmes conditions que la précédente. Avec la méthode qui consiste à mélanger intimement le liquide diastasifère à 10^{cc} de gélatine, les résultats sont les suivants :

VOLUMES EN C.C. DE LA SOLUTION DIASTASIFÈRE	TEMPS DE LIQUÉFACTION
1/2 cc	non liquéfié après 15 jours
1 cc	—
2 cc	—
3 cc	—
4 cc	liquéfié au 9e jour
5 cc	— au 6e jour
6 cc	— au 2e jour

Il est à remarquer que les doses de 1/2, 1, 2 et 3 ^{cc}, qui amenaient une prompte liquéfaction avec le liquide de culture d'*Asp. fumigatus*, sont impuissantes ici à produire le même résultat. Il faut arriver à une dose de 6 ^{cc} pour obtenir une liquéfaction; et, dans ces conditions, l'addition de ce volume de liquide, en abaissant le titre de la solution gélatineuse, affaiblit par là-même la résistance qu'elle était en état d'opposer au principe liquéfiant.

Rhizomucor parasiticus. — Avec cette espèce les résultats sont à très peu de chose près, les mêmes qu'avec l'espèce précédente. J'ai encore constaté l'insuffisance de 2 et 3 ^{cc} de liquide de culture pour produire la liquéfaction, malgré une exposition prolongée à la température de 22°.

Les résultats obtenus avec la méthode de Mette appliquée à l'étude de la gélatinase, relativement à ces deux dernières espèces, R.E et R.P, ne sauraient être pris en considération ; on conçoit que la liquéfaction doit être laborieuse et longue dans ce cas. En effet, celle que j'ai observée au bout d'une *vingtaine de jours* a coïncidé avec des contaminations, capables elles-mêmes d'avoir provoqué cette action.

Le faible pouvoir gélatinolytique de ces deux espèces est encore plus frappant quand on le compare à celui des espèces qui suivent :

Microsporum canis. — Toutes conditions étant les mêmes que précédemment, cette espèce a donné les résultats suivants :

VOL. EN C.C. DU LIQUIDE DIASTASIFÈRE	TEMPS DE LIQUÉFACTION
3 ^{cc}	N'a pas repris son état de gelée
2	10 minutes
1	22 —
1/2	48 —

Devant une puissance de liquéfaction aussi remarquable, et déjà prévue d'ailleurs, j'ai recherché avec quelle dose minimum de liquide diastasifère l'action liquéfiante se manifesterait encore.

Pour cela, j'ai introduit le filtrat de culture par fractions de cent. cubes dans les tubes de gélatine, en prenant comme unité le nombre

de gouttes renfermées dans un cent. cube, et en allant ainsi jusqu'à la dose d'une seule goutte. Les résultats sont les suivants :

VOLUMES EN FRACT. DE CENT. CUBES DU LIQUIDE DIASTASIFÈRE	TEMPS DE LIQUÉFACTION
1 cc ou 14 gouttes	21 minutes
12 —	29 —
10 —	36 —
8 —	46 —
6 —	58 —
4 —	1 heure 6 minutes
2 —	1 — 30 —
1 —	2 — 25 —

Ce tableau donne une idée de la puissante activité gélatinolytique du liquide de culture de *Microsporum canis*, puisqu'une seule goutte suffit encore pour liquéfier 150 fois son volume de la solution gélatineuse, en moins de temps que ne l'ont fait 2 cc du liquide de culture d'*Asp. fumigatus* aux mêmes températures. Un tube témoin préparé avec 8 cc de liquide bouilli au B. M., c'est-à-dire avec 112 fois la dose active précédente, reste indéfiniment solide ; ce qui démontre amplement que toute cause étrangère à un principe diastasique doit être écartée ici dans le phénomène liquéfiant.

Un indice de la rapidité de l'action liquéfiante nous est encore donné par ce fait qu'un tube de gélatine ayant reçu 3 cc de liquide de culture de *Microsporum* perd immédiatement la faculté de se reprendre en gelée malgré la température du courant d'eau dans lequel il est maintenu. Là cependant, le tube témoin avec 8 cc de liquide bouilli, reprend sa consistance première en moins de 10 minutes.

Cette puissance gélatinolytique si considérable, entraîne comme conséquence l'obligation de produire de très basses températures pour ramener la prise en masse de la gélatine une fois que la liquéfaction s'est accomplie, ainsi que le montrent les chiffres suivants :

(1) Avec un tel liquide, la filtration au Berkefeld devient parfaitement inutile. La liquéfaction s'effectue si promptement qu'elle ne saurait être attribuée à des agents de contamination. Mais comme cette rapidité d'action est loin de se reproduire avec les autres espèces cryptogamiques étudiées ici, la même technique s'imposait pour tous les liquides de culture, afin que les résultats soient plus comparables.

VOLUME EN c.c. DE LA SOLUTION DIASTASIFÈRE	TEMPS ÉCOULÉ DEPUIS LA LIQUÉFACTION	TEMPÉRATURE DE LA REPRISE EN MASSE
3 cc	1 heure	—10°
2	d°	— 8°
1	d°	— 4°
1/2	d°	— 2°
1 2	24 heures	au-dessous de —14°

J'ai donné plus haut l'explication de ce phénomène qui me semble la plus rationnelle ; je ne saurais l'approfondir sans sortir du cadre de ce travail.

Le procédé des tubes de Mette remplis de gélatine a été appliqué ici. Les résultats concordent bien avec les précédents ; ils témoignent aussi d'une action énergiquement liquéfiante. Les longueurs de gélatine disparues à chaque extrémité du tube sont :

2 m/m au bout de 2 heures.
5 m/m — 6 —

Achorion Shœnleini. — Avec cette espèce, l'activité gélatinolytique du filtrat de culture mesurée suivant le premier procédé, est la suivante :

VOLUME EN C. C. DE LA SOLUTION DIASTASIFÈRE	TEMPS DE LIQUÉFACTION
3 cc	1 heure
2 cc	2 —
1 cc	3 h. 1/4
1/2 cc	5 h. 1/2

Ces mêmes tubes, soumis au refroidissement après leur liquéfaction, donnent les résultats suivants :

VOLUME EN c.c. DE LA SOLUTION DIASTASIFÈRE	TEMPS ÉCOULÉ DEPUIS LA LIQUÉFACTION	TEMPÉRATURE DE LA REPRISE EN MASSE
3 cc	1 heure	+ 3°
3 cc	2 —	— 6°
2 cc	2 —	— 4°
1 cc	1 —	+ 4°
1 cc	2 —	0°

L'influence du temps écoulé après la liquéfaction, et celle de la dose de liquide actif introduit, sur le retard à la prise en masse de la gélatine au refroidissement, se trouvent ainsi confirmées à nouveau.

Trichophyton gypseum. — Avec cette espèce les résultats sont les suivants :

VOLUMES EN c.c. DE LIQUIDE DIASTASIFÈRE INTRODUIT	TEMPS DE LIQUÉFACTION
3 cc	1 h. 5 minutes
2 cc	2 h. 3/4
1 cc	4 h.
1/2 cc	6 h.

Toutes ces observations sur le pouvoir gélatinolytique des liquides de culture des champignons étudiés, permettent encore de les ranger en deux groupes : l'un à pouvoir gélatinolytique considérable, dont le type est *Microsporum canis* ; l'autre à pouvoir gélatinolytique très faible, dont le type est *Rhizomucor parasiticus.*

---

§ 7. COMPARAISON DES POUVOIRS PROTÉOLYTIQUES. CONSIDÉRATIONS SUR L'INDIVIDUALITÉ DES DIASTASES : CASÉASE, TRYPSINE, GÉLATINASE.

Cette étude des diastases : caséase, trypsine et gélatinase, dont les actions se sont manifestées dans des conditions toujours comparables, autorise maintenant la discussion de leur individualité ou de leur identité. Les remarques intercalées dans le cours de l'étude qui précède donneront toute facilité pour répondre assez brièvement aux questions posées. Pour cela, il suffira de retenir parmi les résultats obtenus, les divergences ou les analogies capables de servir à la discussion, et je grouperai en quelques phrases, les raisons qui me paraissent plaider en faveur de l'individualité des trois diastases en question.

1° Le liquide de culture de *Rhizomucor parasiticus* digère bien la

caséine, mais ne digère pas l'albumine (1) ; il renferme par conséquent une caséase, mais pas de trypsine, puisque ce liquide est incapable d'action sur l'albumine en milieu alcalin. Ce sont donc ici deux diastases distinctes.

2° Le même liquide de culture ne liquéfie pas, ou liquéfie très faiblement la gélatine. Or, il digère très aisément la caséine. La caséase qu'il contient est donc incapable de se substituer à la gélatinase dans les mêmes conditions. Ce sont donc encore deux diastases distinctes, car leurs actions ne sauraient être prises l'une pour l'autre.

La caséase ne pouvant être identifiée à la gélatinase, non plus qu'à la trypsine, possède donc ici une individualité propre (2).

3° Le liquide diastasifère de *Microsporum canis*, si riche en gélatinase dissout en même temps la fibrine et la caséine ; mais, comme il dissout incomparablement mieux et plus vite, la gélatine que toute autre matière albuminoïde, on peut et l'on doit distinguer la gélatinase de la caséase et de la trypsine, et lui reconnaître aussi une individualité propre. Car, ainsi que je l'ai fait remarquer, il n'est pas indispensable pour conclure à la non-identité de deux diastases, de constater la présence de l'une, en même temps que l'absence absolue de l'autre ; il suffit seulement d'observer entre leurs deux actions une disproportion marquée, bien évidente. Ces conditions sont évidemment remplies ici.

On pourrait objecter que les diastases dont je n'ai pu constater la présence sont peut-être restées adhérentes au protoplasma cellulaire, comme cela se passe fréquemment dans le monde des diastases. Je n'ai pas cherché à contrôler cette hypothèse car, lors même qu'elle serait vérifiée mes considérations d'individualité ne s'en trouveraient que mieux confirmées. En effet, si de deux diastases soupçonnées identiques, l'une diffuse dans le milieu de culture, et l'autre demeure

(1) Il se pourrait que ce champignon inapte à digérer l'albumine soit cependant capable de sécréter des diastases ayant les mêmes propriétés que l'entérokinase ; c'est-à-dire capables de conférer un pouvoir albuminolytique au liquide pancréatique normalement inactif. Cela, je ne l'ai pas vérifié.

(2) Cependant, il convient de faire des réserves à ce suj t, car il se peut que nos champignons, ou quelques-uns d'entre eux, soient producteurs d'érepsine. Or, la présence simultanée de caséase et d'érepsine dans les champignons Basidiomycètes (Bourquelot et Herissey, puis Delezenne et Mouton, voir Index bibliogr.) laisse à penser qu'elles peuvent être très voisines ; et, Javillier dans son étude sur le suc cellulaire d'ivraie, envisage l'identité possible de la caséase avec l'érepsine.

J'ai tenu à attirer l'attention sur ces quelques points afin de montrer qu'ils ne m'ont pas échappé ; et, si je me suis borné à les faire remarquer sans les aborder, c'est que dans un sujet aussi vaste, et auquel se rattachent tant de questions essentielles, je ne pouvais songer à le faire sans sortir des limites que je m'étais tracées.



intra-cellulaire, il y a justement en cela, un argument suffisant pour les séparer et affirmer qu'elles sont distinctes.

Je n'ai pas la prétention, par cette étude, d'avoir apporté la lumière définitive sur l'individualité des diastases : caséase, trypsine et gélatinase. Mes recherches permettent néanmoins d'affirmer, que dans les conditions où ces diastases sont produites et étudiées ici, elles apparaissent avec des caractères de spécifité incontestables.

Il se dégage en outre de ces recherches une conséquence importante ; c'est que l'on ne saurait substituer un pouvoir protéolytique à un autre, et s'en tenir à la constatation de l'un d'entre eux pour admettre l'existence des deux autres, ou même d'un seul. Ainsi : l'évaluation du pouvoir caséinolytique du liquide de culture de *Rhizomucor parasiticus* ne saurait être faite à l'aide de son pouvoir albuminolytique, puisque ce dernier est nul.

De même, la méthode de Fermi, qui consiste à mesurer l'activité tryptique d'un liquide à l'aide de son action sur la gélatine, ne doit être acceptée qu'avec toute prudence, car on attribuerait ainsi au liquide de culture de *Microsporum canis* un pouvoir albuminolytique bien supérieur à celui qu'il possède.

A la suite de recherches du même genre, nombre d'auteurs ont émis des conclusions identiques aux miennes.

Malfitano (1) a pu constater chez la Bactéridie charbonneuse l'indépendance du pouvoir albuminolytique et du pouvoir gélatinolytique.

Delezenne (2), en étudiant le venin des serpents, a aussi constaté l'individualité bien nette de ces deux pouvoirs.

Javillier, (3) puis Labbé (4) ont fait la même constatation ; le premier avec le suc cellulaire d'ivraie, le second, avec les sécrétions glandulaires des feuilles de Droseras.

L'albuminolyse et la caséinolyse ont été également, à plusieurs reprises, considérées comme produites par des diastases distinctes. Delezenne et Mouton (5), Bourquelot et Herissey (6), avec les macérés

(1) Malfitano : Sur la dissociation du pouvoir albuminolytique et du pouvoir gélatinolytique de la protéase charbonneuse. C. R. Sté de Biologie. t. LV, p. 843. 1903.

(2) Delezenne : Sur l'existence d'une kinase dans le venin des serpents. C. R. Acad. des Sc., t. CXXXV, p. 328, 1902.

(3) Javillier : Contributions à l'étude de la présure chez les végétaux. Joannin. Paris 1903.

(4) Labbé : Du rôle des microorganismes dans les phénomènes de digestion observés chez le *Drosera rotundifolia*. Laval Goupil, 1904.

(5) Delezenne et Mouton : Sur la présence d'une kinase dans quelques champignons Basidiomycètes C. R. Ac., d. Sc. t. CXXXVI, p. 636. 1903.

(6) Bourquelot et Herissey : Sur la présence d'un ferment soluble protéo-hydrolytique dans les champignons. Bull. Soc. Mycol de France, t. XV, p. 60, 1899.

de divers champignons Basidiomycètes ; Launoy (1), avec le venin des serpents, Javillier avec le suc cellulaire d'ivraie, ont été conduits à cette déduction.

D'après les recherches de quelques auteurs, la caséase et la gélatinase sembleraient avoir quelques ressemblances. On a remarqué assez souvent leur association et leur parallélisme d'action.

Dans le suc cellulaire d'ivraie, Javillier les trouve associées.

MM. Bodin et Lenormand (2), les retrouvent encore ensemble chez la forme *Oospora* du *Microsporum* du Cheval.

MM. Victor Henri et Larguier des Bancels (3), en s'appuyant sur des considérations d'un autre ordre, veulent également y voir deux ferments solubles identiques.

Moi-même, j'ai trouvé ces deux diastases associées chez un certain nombre de champignons parasites ; mais cela ne suffit pas pour conclure à leur identité. Au contraire, chez quelques espèces, j'ai constaté leur séparation assez nettement, pour plaider leur individualité.

Cette étude sur les sécrétions diastasiques de quelques cryptogames parasites tend à multiplier le nombre déjà considérable des diastases des albuminoïdes. Pour beaucoup de savants, ce nombre serait encore plus élevé ; chaque substance albuminoïde aurait sa diastase digestive propre, et leur structure moléculaire serait en rapport avec celle de la diastase correspondante.

Bien qu'incomplètement connues, l'architecture moléculaire de la gélatine, celles de l'albumine et de la caséine, diffèrent assez entre elles pour qu'on puisse admettre *à priori*, qu'à chacune de ces substances correspond une diastase bien spécifique.

Dans la transformation des sucres par les diastases, on a déjà relevé des phénomènes du même ordre ; et la multiplicité des diastases des hydrates de carbone, rend d'ores et déjà, très admissible celle des diastases des albuminoïdes. Les analogies entre ces deux groupes de diastases deviennent de plus en plus nombreuses ; mais on ne doit pas perdre de vue que le fait expérimental auquel on doit toujours faire appel, celui qui permet de conclure sans ambiguïté, est lié à la parfaite connaissance des substances albuminoïdes, laquelle nous fait encore défaut.

---

(1) Launoy : Sur l'action protéolytique des venins. C. R. Ac. d. Sc., t CXXXV, p. 401-403, 1902.
(2) Bodin et Lenormand : Ann. de l'Instit. Pasteur t. XV, p. 285, 1902.
(3) Victor Henri et Larguier des Bancels : Loi d'action de la trypsine sur la gélatine. C. R. Sté de Biologie. t. LV, p. 866, 1903.

CHAPITRE IV

Recherche et présence de l'émulsine.

L'émulsine est un ferment soluble très répandu chez les végétaux et les animaux.

Comme les diastases des sucres, elle agit en fixant sur la substance à transformer, une ou plusieurs molécules d'eau ; mais elle en diffère cependant, en ce qu'elle exerce son action, indifféremment sur tout un groupe de composés appelés glucosides.

Les glucosides sont des principes divers, abondants dans les cellules végétales. On peut les considérer comme une combinaison du glucose avec des corps de la série grasse ou aromatique à fonction acide, alcool ou phénol. Ces glucosides sont susceptibles de se dédoubler par hydratation ; et, dans les cellules vivantes, ce dédoublement, comme tant d'autres, est effectué par un enzyme : l'émulsine ou synaptase.

Le type de son action est celle qu'elle exerce sur l'amygdaline ; mais cette action s'exerce aussi sur d'autres composés tels que : la salicine, l'esculine, la coniférine, l'hélicine, l'arbutine, etc. Elle se fait sur tous suivant le même plan. Il y a hydrolysation et dédoublement avec mise en liberté de glucose, et d'une autre substance, variable suivant la nature du glucoside.

La présence de l'émulsine dans les végétaux supérieurs a été signalée dès 1847, par Liebig et Wöhler. Les nombreuses recherches qui se sont poursuivies à ce sujet ont montré qu'un ferment analogue, sinon identique, est abondamment répandu dans tout le règne végétal, où sa présence coïncide le plus souvent avec des glucosides.

On a dressé de longues listes de végétaux renfermant de l'émulsine ; enfin, j'ai indiqué au début de ce travail, que sa présence avait été signalée chez quelques champignons inférieurs.

Je l'ai moi-même recherchée et décelée chez les espèces parasites suivantes :

Aspergillus fumigatus — Rhizopus equinus — Rhizomucor parasiticus — Trichophyton gypseum — Achorion Shœnleini — Microsporum canis.

Ces champignons végètent mal sur une solution d'amygdaline à 3 p. 100. Les trois premiers forment un voile très mince, léger et poudreux ; les autres s'y développent à peine. En ajoutant un peu de peptone au liquide de culture, la croissance se fait plus aisément et l'on peut percevoir, au bout de 5 à 6 jours d'exposition à l'étuve à 30°, une légère odeur d'amandes amères qui annonce le dédoublement de l'amygdaline.

Mais, j'ai constaté pour ces espèces que la production d'émulsine n'est pas subordonnée à la présence de glucosides dans le bouillon de culture. La méthode que j'ai utilisée diffère un peu de celle que MM. Bourquelot et Hérissey ont employé pour l'*Aspergillus niger ;* c'est celle qui m'a servi dans les expériences précédentes, et que j'ai indiquée en un paragraphe spécial.

Les liquides de culture glucosés peptonisés, ou glycérinés peptonisés ne renfermant plus trace de glucose ou de peptone, sont filtrés à la bougie Berkefeld et introduits purement dans des tubes à essai contenant une solution d'amygdaline, elle-même stérile. Cette solution a été stérilisée ; non à l'autoclave, où la température élevée est susceptible de lui faire subir un commencement de dédoublement, mais par filtration à la bougie poreuse (1). Elle est ensuite immédiatement répartie par 10 cc dans des tubes à essai stérilisés.

Pour chaque espèce de champignons étudiés, les tubes préparés sont au nombre de cinq : A, B, C, D, E.

A est additionné de 4 cc du filtrat de culture glucosé peptonisé.
B — 4 cc — — — bouilli.
C — 4 cc du filtrat de culture glycériné peptonisé.
D — 4 cc — — — bouilli.
E est laissé tel, sans addition de liquide diastasifère.

Les tubes B, D, E constituent un groupe de témoins nécessaires pour caractériser l'allure diastasique de la réaction de dédoublement.

Tous les tubes sont soumis à l'étuve à 37°. L'équation chimique qui représente le dédoublement de l'amygdaline est la suivante :

$$C^{20}H^{27}AzO^{11} + 2\ H^{2}O = 2\ C^{6}H^{12}O^{6} + C^{7}H^{6}O + HCAz$$

(1) L'emploi des antiseptiques habituels, comme préservatifs de la contamination par les germes de l'air, offre ici quelques inconvénients qu'il importe d'éviter. Outre celui de n'offrir qu'une asepsie restreinte, suffisante cependant pour des recherches qualitatives, outre aussi l'influence entravante qu'ils peuvent exercer sur la diastase, ils offrent encore le désavantage comme le thymol, le phénol, le chloroforme, de masquer assez fortement l'odeur d'amandes amères qui annonce le dédoublement de l'amygdaline. De plus, le chloroforme offre le grave inconvénient de réduire la liqueur de Fehling et par suite de s'opposer à tout dosage rigoureux du sucre réducteur mis en liberté.

La décomposition qui s'effectue a pour effet de mettre en liberté trois composés définis : un glucose, de l'aldéhyde benzoïque et de l'acide cyanhydrique. Pour avoir la preuve de la réaction effectuée, il suffira de constater dans le liquide soumis à l'expérience, la présence d'un ou de plusieurs de ces corps. Voici quelles sont ces constatations après quatre jours d'exposition des tubes à amygdaline à 37° :

1° Odeur très nette d'essence d'amandes amères qui révèle la présence de l'aldéhyde benzoïque. Cette odeur existe dans les tubes A et C seulement ; elle n'existe pas dans les tubes témoins.

2° Existence d'acide cyanhydrique, établie par les réactions suivantes, faites sur le distillat du liquide en expérience :

a) Réaction de Liebig ; formation de sulfocyanate d'ammonium qui donne une vive coloration rouge avec les sels ferriques.

b) Réaction de Shönbein, extrêmement sensible, qui consiste à ajouter au distillat quelques gouttes d'une solution de sulfate de cuivre à 1 p. 1000 et quelques gouttes de teinture fraîche de gaïac. Une coloration bleue se produit en présence de traces d'acide cyanhydrique.

Ces trois réactions caractéristiques se sont produites avec netteté dans les tubes A et C, jamais dans les tubes témoins B, D et E.

3° Présence de sucre réducteur, constatée à l'aide de la liqueur de Fehling dans les tubes A et C seulement.

L'expérience, telle que je l'ai conduite pour chacun des champignons désignés, m'a permis en outre de doser le glucose mis en liberté, et de mesurer ainsi, approximativement du moins, le degré d'activité de l'émulsine. Au bout de 4 jours d'exposition à 37° les 30 cg d'amygdaline sont décomposés jusqu'à concurrence de 70 % de la matière première mise en réaction ; car le dédoublement de l'amygdaline par l'émulsine n'est jamais total.

J'ai voulu voir si ces liquides de culture qui décomposent l'amygdaline sont capables de dédoubler d'autres glucosides ; la salicine par exemple.

L'équation du dédoublement de la salicine est la suivante ; il y a mise en liberté de glucose et de saligénine :

$$C^6H^4 < \begin{matrix} CH^2OH \\ OC\,H^{11}O \end{matrix} + H^2O = C^6H^4 < \begin{matrix} CH^2OH \\ OH \end{matrix} + C^6H^{12}O^6$$

De même que pour le dédoublement de l'amygdaline, toute trace de sucre réducteur dans le liquide soumis à l'expérience nous confirmera le dédoublement de la salicine.

Des tubes renfermant une solution de salicine à 1 p. 100, ont été préparés de la même façon que précédemment, et sont désignés par les mêmes lettres conventionnelles. Après 3 jours d'exposition à l'étuve à 37°; seuls, les contenus des tubes A et C permettent la réduction de la liqueur de Fehling.

Dans ces mêmes tubes, j'ai pu caractériser la présence de la saligénine; car cette substance possédant un groupement phénol, possède la propriété caractéristique des phénols de donner une belle coloration avec le perchlorure de fer. On a ici une coloration violette, mais qui apparaît seulement dans les tubes A et C.

La sécrétion d'un ferment soluble agissant comme l'émulsine, a donc lieu d'une façon constante par les six espèces de champignons parasites étudiés; et cette sécrétion n'est pas subordonnée à la présence de glucosides dans le milieu nutritif.

CHAPITRE V

Réaction du type oxydasique.

A mesure que des recherches de plus en plus nombreuses et approfondies nous ont mieux fait connaître les diastases, le nombre de ces dernières s'est considérablement accru.

Dans le groupe des ferments oxydants en particulier, dont on s'est tant occupé ces dernières années, on a mis au jour des faits nouveaux qui ont imposé un classement des nombreuses substances à réaction oxydasique, classement quelquefois remanié. Aussi, devient-il quelquefois difficile en l'état actuel de la question, et devant la diversité des substances à réaction oxydante, de se prononcer sur la valeur et la place d'une réaction de ce genre. Les recherches de Linossier, Carnot, Dupouy, etc., sur les pouvoirs oxydants de divers liquides de l'organisme, montrent bien avec quelle prudence et quelle réserve les résultats d'observations de cette nature doivent être rapprochés de ceux, bien typiques, que présentent les oxydases vraies.

J'ai été conduit, dans l'étude des champignons pathogènes objets de ce travail, à observer une réaction de nature oxydasique présentée par leurs liquides de culture. Cette réaction se manifeste dans des conditions spéciales, mais assez bien définies pour permettre de caractériser la nature de la réaction, et de préciser la mesure dans laquelle elle peut être rapprochée des réactions oxydasiques types.

J'ai remarqué que les liquides de culture de divers champignons parasites (*Aspergillus* pathogènes, *Trichophyton*, *Achorion*, *Microsporum*) donnent en présence de traces *infinitésimales* d'un sel de manganèse (chlorure, sulfate ou autre sel) les réactions des oxydases, et seulement dans ces conditions.

Voici les expériences qui m'ont amené à faire cette constatation.

Si, à cinq cent. cubes environ d'un liquide de culture, d'*Aspergillus fumigatus* par exemple, — soit le bouillon glucosé peptonisé ou glycériné peptonisé, soit le Raulin, — on ajoute deux à trois gouttes d'une solution d'un sel manganeux à 1 p. 1000, puis, qu'après avoir bien effectué le mélange, on introduise un peu de teinture de gaïac, on observe que l'émulsion produite, bleuit rapidement. La coloration apparaît immédiatement et augmente peu à peu d'intensité. Pourtant elle n'est pas franchement bleue comme celle que l'on obtient avec les oxydases végétales ; elle reste un peu verdâtre. Cela tient en partie à la coloration jaunâtre du liquide primitif, car avec le liquide de culture soumis à une décoloration préalable, la couleur obtenue est d'un bleu plus franc.

La même coloration se produit encore très nettement avec une seule goutte de la solution manganique ; ce qui représente une proportion d'environ 2 p. 100.000 du sel de manganèse employé. La réaction colorée a encore lieu avec quelques gouttes d'une solution manganique à 1 p. 10.000 et on la perçoit encore nettement, quoique affaiblie, avec quelques gouttes d'une solution à 1 p. 100.000. La coloration bleue verdâtre de l'émulsion de gaïac est assez fugace ; au bout de 5 à 6 heures, elle est en voie de disparition.

En mélangeant le liquide de culture avec une solution aqueuse à 1 p. 100 d'hydroquinone, on obtient une belle coloration rose du mélange, qui fonce peu à peu, devient écarlate, puis rouge vineux au bout du deuxième jour. Avec une solution d'acide pyrogallique à 2 p. 100, la coloration obtenue est d'abord jaunâtre ; elle s'accentue et devient peu à peu rougeâtre.

Lorsque ces réactions sont conduites ainsi que je l'ai fait, dans des ballons fermés à la lampe, au sein d'une atmosphère limitée par conséquent, on remarque qu'il se produit un vide partiel dû à la disparition d'une partie de l'oxygène intérieur qui a servi à l'oxydation du principe phénolique.

Le mycélium lavé à l'eau distillée, et mis à macérer dans de l'eau glycérinée pendant deux jours, concède au liquide de macération la propriété de donner la même réaction colorée que le liquide de culture, et souvent même avec plus d'intensité.

Le tableau suivant résume comparativement, les résultats que donnent avec la teinture de gaïac : 1° le liquide de culture, 2° le liquide de macération.

NATURE DES LIQUIDES EMPLOYÉS		A Sans addition de sel de manganèse	B Addition de 3 gouttes d'une solution de sel de manganèse au $\frac{1}{1000}$	C Addition de 3 gouttes d'une solution de sel de manganèse au $\frac{1}{10000}$	D Addition de 3 gouttes d'une solution de sel de manganèse au $\frac{1}{100000}$
Liquide de culture	bouillon glucosé 1	Pas de coloration	Coloration bleuâtre	Coloration moyenne	Faible coloration
	bouillon glycériné 2	—	—	—	—
Liquide de macération	bouillon glycériné 4	—	—	—	—
	bouillon glucosé 3	—	—	—	—

L'apparition du bleuissement se fait avec le même degré de rapidité dans les différents tubes ; son intensité seule varie, et se trouve en rapport avec la quantité ou le titre de la solution manganique introduite ; elle se montre par suite plus vigoureuse dans les tubes de la série B.

Au bout d'une demi-heure, les colorations rangées par ordre d'intensité sont les suivantes : B_4, B_3, C_3, B_1, C_4, B_2. Ce qui indique, chez les liquides de macération, une activité plus grande que chez les liquides de culture eux-mêmes. Le protoplasma des cellules mycéliennes est donc, malgré un lavage, resté puissamment imprégné de la substance dont l'association au manganèse forme un système oxydant.

Dans une autre série d'expériences, j'ai modifié ainsi qu'il suit la manière d'opérer. La solution saline de manganèse est ajoutée aux liquides de culture avant leur ensemencement, et dans des proportions convenables pour que chaque bouillon soit amené au titre de 1 p. 1000 en manganèse, ou même au titre de 1 p. 10000.

Dans ces conditions, le champignon végète avec la même facilité et, après un mois de végétation, le liquide de culture donne directement, sans addition de nouvelles traces de manganèse, les réactions citées plus haut, tant avec la teinture de gaïac qu'avec la solution d'hydroquinone ou de pyrogallol

Il convient de faire remarquer que les solutions salines de manganèse, utilisées même à un titre élevé (10 p. 100), sont incapables à *elles seules* de bleuir la teinture de gaïac, et de donner avec les polyphénols des réactions colorées aussi intenses et aussi rapides, que celles que j'ai signalées plus haut. D'autre part, les liquides de culture essayés eux-

mêmes de semblable façon avant leur ensemencement se sont montrés incapables de fournir les réactions signalées.

Il y a eu nécessairement, élaboration par le champignon dans son milieu de culture, d'une substance douée de la propriété de former avec le manganèse, un complexe à pouvoir oxydant.

Quelle est maintenant la nature de cette substance ?

Normalement, et par eux-mêmes les liquides de culture sont dépourvus de pouvoir oxydant. En présence d'eau oxygénée, ils sont de même incapables de bleuir la teinture de gaïac. Soumis à l'action de la chaleur aux températures où les oxydases sont habituellement détruites, ils conservent associés au manganèse, leur faculté d'oxydation. Ces constatations excluent toute hypothèse d'une substance oxydante de nature diastasique qui aurait besoin, pour manifester son action, d'être secondée par un adjuvant tel que le manganèse.

Il reste à envisager l'intervention de substances non diastasiques élaborées par le cryptogame, et dont le rôle serait de favoriser l'action du manganèse, qui comme on le sait, est doué d'un pouvoir oxydant naturel. Le manganèse serait alors le principe actif, auquel le principe abandonné par le végétal dans son liquide de culture servirait d'activant.

M. G. Bertrand (1), dans un ordre d'idée bien voisin, a montré qu'une oxydase du type de la laccase représente « un système de deux substances complémentaires » : l'une, représentée par le manganèse, serait la complémentaire active ; l'autre, représentée par une substance organique, serait la complémentaire activante. Je me suis demandé si, dans le cas étudié ici, il n'y aurait pas quelque chose de comparable, tout en écartant l'idée d'une assimilation complète avec le phénomène qu'envisage la théorie de M. Bertrand.

Avant de répondre à cette question, je crois devoir rappeler ici le mécanisme d'oxydation du manganèse si bien mis en lumière par M. G. Bertrand (2). Ce savant a montré comment les sels manganeux pouvaient à eux seuls, fixer l'oxygène sur certains corps oxydables sans se détruire.

Cette propriété catalytique qui fait du manganèse un véritable ferment organique, s'explique ainsi qu'il suit :

(1) G. Bertrand : *Le domaine actuel de la chimie biologique.* Revue g^le des sciences, 30 mai 1905.

(2) G. Bertrand : Sur l'action oxydante des sels manganeux et sur la constitution chimique des oxydases. C. R. Ac. d. Sc., t. CXXIV, 1897.



Une partie du sel manganeux est hydrolysée en solution aqueuse et donne du protoxyde et de l'acide libre.

$$(1)\quad RMn + H^2O = RH^2 + MnO$$

Le protoxyde formé, s'oxyde très aisément et immédiatement au contact de l'air; il donne du bioxyde à l'aide d'un atome de la molécule d'oxygène ; l'autre atome est mis en liberté.

$$(2)\quad MnO + O^2 = MnO^2 + O$$

Le bioxyde régénère le sel manganeux au contact de l'acide libre. De ce fait, un 2e atome d'O est mis en liberté.

$$(3)\quad MnO^2 + RH^2 = RMn + O$$

L'O libre en (2) et (3) est d'autant plus apte à fournir une oxydation qu'il se trouve à l'état naissant, et sous forme d'atomes non saturés. Le sel primitif est régénéré, et prêt à recommencer le cycle des réactions.

On comprend d'après cela que toutes les conditions capables de favoriser la réaction (1) (formation de protoxyde) et, conséquemment, les réactions (2) et (3) auront pour effet de provoquer en définitive, une mise en liberté plus considérable d'atomes d'O, et par suite, de donner lieu à une exagération des réactions colorées que fournit le manganèse dans ses réactions d'oxydation naturelles.

Or, les alcalis ont précisément cette propriété ; ils donnent avec les sels manganeux, du protoxyde hydraté, lequel fixe spontanément l'oxygène de l'air pour se transformer en bioxyde hydraté.

Cette réaction est du même ordre que la simple hydrolyse d'un sel de manganèse en solution aqueuse, indiquée par M. Bertrand, (réact. 1).

Il en résulte que des traces d'alcali ajoutées à une solution même diluée d'un sel manganeux, ou réciproquement, auront pour effet d'accroître dans des proportions considérables le pouvoir oxydant naturel du manganèse.

M. Trillat (1) a en effet indiqué récemment, l'influence activante de la soude et de la potasse sur la puissance d'oxydation du manganèse.

C'est un phénomène analogue que je retrouve ici.

Les liquides nutritifs des champignons possèdent une forte réaction alcaline due à la présence de composés ammoniacaux fixes ou volatils, produits de l'activité vitale des microorganismes. Or, ce sont ces composés ammoniacaux *volatils*, dont je n'ai pas cherché à déterminer la nature chimique exacte, qui, associés au manganèse, forment le complexe oxydant dont j'ai signalé les réactions.

(1) Trillat : *Influences activantes ou paralysante agissant sur le Mn envisagé comme ferment métallique.* — C. R. Acad. d. Sc., t. CXXXVII, p. 922, 925, 1903.



Cette interprétation est justifiée et contrôlée de la façon suivante :

Si l'on distille une certaine quantité d'un liquide de culture jusqu'à ce que le dégagement de vapeurs ammoniacales ait cessé, et si l'on recueille les vapeurs dans de l'eau distillée, on remarque que le distillat donne maintenant les réactions d'oxydation que l'on sait, en présence de sel de manganèse ; tandis que le résidu, qui ne renferme plus que des composés ammoniacaux fixes, ne donne plus aucune de ces réactions.

Le facteur activant du manganèse apparaît maintenant, déterminé dans une certaine mesure ; ce sont des bases volatiles, ammoniaque, amines ou autres produits, engendrées dans l'acte de la désassimilation cellulaire du végétal. Elles agissent sur le sel métallique à la façon des alcalis en provoquant la formation des hydrates manganeux et manganique, et consécutivement, la mise en liberté d'oxygène prêt à réagir sur des corps oxydables.

Il n'y a donc, dans les réactions présentées plus haut par les liquides de culture, rien de comparable à celles que produisent les ferments organiques. Elles sont uniquement dues à un ferment oxydant inorganique, le manganèse, dont le pouvoir oxydant est amplifié par l'adjonction de principes ammoniacaux volatils, qui se trouvent normalement au sein des liquides de culture.

Je considère néanmoins que ces faits s'allient assez bien aux remarquables interprétations de M. G. Bertrand sur le mode de constitution des oxydases. Ils ne peuvent qu'en faire ressortir l'importance, car je viens de montrer comment un produit de l'activité d'un organisme, peut jouer le rôle de substance complémentaire activante, par rapport à une molécule minérale qui remplit le rôle de complémentaire active. Le système réalisé par leur association possède quelques propriétés des oxydases, et entre autres, leur faculté d'oxydation.

Sans doute, le complexe ainsi formé ne saurait être identifié à une oxydase du type de la laccase ; mais le rapprochement m'a paru intéressant à établir, car il montre la réalisation synthétique d'un complexe oxydasique, conforme à celui que M. Bertrand envisage analytiquement chez la laccase.

DEUXIEME PARTIE

SÉCRÉTIONS TOXIQUES

CHAPITRE PREMIER

Toxines.

Généralités et Historique.

---

§ 1. LES TOXINES MICROBIENNES ET LE MÉCANISME INFECTIEUX.

D'une façon générale, les agents infectieux, bactéries, champignons, etc., exercent sur l'organisme des actions fort complexes, dont les causes ne nous sont pas toujours connues. Des désordres suivent ; parfois superficiels et localisés, d'autrefois généralisés et graves.

Plusieurs théories sont invoquées pour expliquer l'origine des troubles morbides qui succèdent en général à l'infection microbienne.

La théorie mécanique concède à l'agent infectieux, la faculté d'agir mécaniquement sur les tissus, et d'intervenir au même titre qu'un corps étranger dans le fonctionnement des organes, pour y apporter quelque grave perturbation.

La théorie vitale fait intervenir la lutte entre le microbe et la cellule de l'organisme. De part et d'autre, chaque élément cherche à assurer sa propre existence aux dépens de matériaux communs ; il en résulte une concurrence vitale, et le conflit se termine suivant les circonstances, à l'avantage du microbe envahisseur ou de la cellule envahie. Si cette dernière succombe, l'infection microbienne se développe.

Une troisième théorie invoque l'empoisonnement de l'organisme par des substances toxiques, élaborées soit par le microbe, soit par la cellule de l'organisme en vue de sa défense.

Cette dernière théorie n'en est plus une à proprement parler ; car, étayée par de nombreux faits, elle rend compte maintenant de la plupart des accidents dûs aux bactéries pathogènes.

C'est en effet une vérité qui s'affirme de jour en jour, que dans les désordres causés par les agents bactériens, l'action mécanique est de faible importance ; celle qui prédomine et réagit le plus fortement sur l'économie, c'est l'action toxique.

Roger a émis quelques opinions qui tendent à généraliser le processus toxi-infectieux. Il admet que tous les parasites quels qu'ils soient, renferment et produisent des substances toxiques. « C'est, dit-il, une loi de biologie générale que les manifestations vitales ont toujours pour conséquences, la formation et le rejet de substances nocives qui provoquent des réactions parfois intenses de la part de l'organisme » (1).

Ne sait-on pas en effet, que les produits appelés diastases, élaborés par les êtres vivants pour assurer leur nutrition, peuvent en partie être nuisibles à l'individu qui les reçoit ?

On a montré (2) que la plupart des diastases injectées sous la peau ou dans le sang d'un animal, produisaient des phénomènes d'intoxication, ou tout au moins une action pyrétogène. D'autre part, les produits de déchet rejetés par le microbe sont également nuisibles à l'organisme parasité ; et, d'après Roger, les matières qui entrent dans la constitution même de son protoplasma ne sont pas inoffensives.

Rien de plus naturel après cela, que d'admettre la présence dans le monde microbien, de substances nocives qui seraient la cause initiale des symptômes graves observés dans la plupart des infections microbiennes.

M'étant proposé dans cette seconde partie de mon travail, de mettre en évidence et d'étudier la production de toxine par un cryptogame infectieux, je crois de quelque utilité de donner un aperçu rapide sur ce que l'on sait actuellement des toxines microbiennes.

L'idée de rapporter le développement des maladies infectieuses à une intoxication est fort ancienne. Mais, les observations qui se rapportent à ce sujet, ne prirent de l'importance qu'à la suite de la découverte des ptomaïnes.

(1) Roger : *Loc. cit.* — *Les maladies infectieuses*. Masson. Paris. 1902.

(2) Roussy : C. R. Soc. Biologie. 30 mars, 27 avril, 25 mai, 1895.

En 1874, A. Gautier avait extrait des cultures de bactéries putréfactives, des poisons chimiques bien définis, ou ptomaïnes, dont il établit le rôle dans la vénénosité des agents qui les produisent.

On étendit ces données aux bactéries pathogènes. Davaine, Toussaint, Chauveau, attribuèrent à certains virus la faculté de donner naissance à des poisons dans l'organisme où ils pullulaient.

En 1880, Pasteur faisait faire un pas décisif à la question. Il montra que les cultures *filtrées* du choléra des poules, injectées à ces oiseaux, les faisaient tomber dans un état de somnolence et de pelotonnement rappelant les symptômes morbides des animaux auxquels on inoculait le virus.

En 1884, Lœffler, dans l'étude qu'il fit du bacille de la diphtérie, reconnut que cet agent infectieux peut provoquer une maladie mortelle, tout en restant localisé en un point de l'organisme. Koch se rallia à cette opinion pour le choléra ; et, plus tard on vérifia le même fait pour le tétanos, le charbon symptomatique, etc. Ces observations étaient des plus démonstratives.

On commença à reconnaitre que les troubles observés dans les maladies bactériennes étaient bien dûs au déversement dans l'organisme, de produits toxiques sécrétés par le virus correspondant; et l'on fut obligé de se rendre compte de leur importance.

On se mit alors à la recherche de ces poisons ; et Brieger, déjà préparé par ses études sur les ptomaïnes de la putréfaction, étendit ses investigations aux microbes pathogènes. Il parvint à extraire des cultures de quelques bacilles, diverses bases vénéneuses, dont l'existence a d'ailleurs été fortement contestée depuis. Quoi qu'il en soit, l'élan était donné; de nombreuses bases alcaloïdiques d'origine microbienne furent décrites.

Enfin, toute une succession d'observations remarquables qu'il serait trop long de citer ici, et qui ont pour auteurs des savants comme Charrin, Chantemesse, Widal, Roux, Yersin, etc., ont contribué à établir cette vérité incontestée, que les bactéries infectieuses agissent sur l'organisme par les produits solubles vénéneux qu'elles sécrétent.

Mais, le mot toxine a pris peu à peu une acception plus générale.

Contrairement à ce qu'on pensait tout d'abord, les toxines alcaloïdiques sécrétées au cours de la vie des microbes pathogènes, n'étaient pas seules, la cause des désordres qui se manifestent durant l'infection. Elles allaient même perdre le rôle principal qu'on leur avait fait jouer si longtemps.

On démontra en effet, que les ptomaïnes extraites des cultures,

étaient loin de posséder le pouvoir toxique de la culture elle-même, et d'en reproduire l'intégralité des phénomènes. On reconnut qu'elles étaient accompagnées de produits beaucoup plus toxiques, dont on établit bientôt la nature albuminoïde.

Hankin, Arloing, Christmas, Brieger, Fränkel et Sydney Martin, parvinrent à l'aide des méthodes classiques de précipitation des albuminoïdes, à retirer de microbes spécifiques (charbon, tétanos, etc.) des principes toxiques solubles, de nature azotée, reproduisant mieux que les ptomaïnes, les symptômes évolutifs de la maladie.

On considéra tour à tour ces nouveaux poisons comme des albumines, des peptones, des globulines, etc., et on les baptisa du nom de *toxalbumines ;* c'est-à-dire albuminoïdes toxiques.

La découverte des toxalbumines ou toxines proprement dites, démontrait ainsi qu'un élément des plus actifs venait dans quelques cas, sinon dans la plupart, ajouter son action à celle des principes alcaloïdiques ou toxines alcaloïdiques. Celles-ci s'effacèrent devant la prépondérance accordée aux facteurs toxiques azotés. Et même actuellement, dans le langage courant, l'on a une tendance à réserver le simple nom de toxine aux toxalbumines, bien que ces dernières méritent plus exactement le nom de toxines vraies ou toxines proprement dites, pour les distinguer des toxines alcaloïdiques.

On verra d'ailleurs jusqu'à quel point la distinction peut être admise.

L'idée de sécrétions microbiennes composées à la fois de ces deux facteurs toxiques de nature différente, contribuant tous deux à l'action morbide, n'est pas unanimement acceptée. Cependant, je ne suis pas éloigné de penser qu'il doit en être généralement ainsi.

Si très souvent, le facteur alcaloïdique est très faiblement représenté, tandis que le facteur toxalbumine exerce le rôle principal ; en revanche, dans certains cas, il pourra être seul présent et devenir l'unique agent susceptible d'engendrer l'intoxication consécutive à l'infection.

Mais à ce propos, une question se pose. Peut-on établir une distinction sûre, absolue, entre les toxalbumines et les ptomaïnes ? Sont-ce là deux groupes de poisons nettement séparés ?

A vrai dire, la ligne de démarcation absolue n'existe pas. Il existe entre les deux groupes que leur nature chimique nous a aidé à distinguer provisoirement, des rapports et des différences de propriétés qui rendent la séparation incertaine, et difficile à établir.

Les toxalbumines possédent quelques-unes des propriétés des diastases ; solubilité dans l'eau, adhérence aux précipités colloïdaux provoqués dans leur solution, destruction par la chaleur au voisinage de 100°, dialysabilité difficile, puissance d'action considérable, etc.

Roux et Yersin dans leur remarquable étude sur la toxine diphtérique, ont montré que la substance toxique sécrétée par le bacille de Lœffler est une véritable diastase. Vaillard l'a de même démontré pour le poison du tétanos. Les deux toxines les mieux étudiées (diphtérique et tétanique) sont pour ainsi dire des diastases toxiques.

Les ptomaïnes, sont au contraire des poisons dont la constitution chimique est susceptible d'être déterminée avec précision. Leur nature et leurs propriétés les éloignent des diastases ; et la plupart des caractères communs aux diastases et aux toxalbumines ne sauraient leur convenir.

Cependant, la distance qui sépare les toxines vraies des ptomaïnes n'est pas toujours aussi considérable ; certaines toxalbumines opposent à la chaleur une assez grande résistance. Tandis que les toxines diphtérique et tétanique, par exemple, sont détruites à la température de 100° ; celles du charbon symptomatique, du vibrion septique, de la tuberculose, de la morve, etc. peuvent, sans s'altérer sensiblement, supporter de plus hautes températures, 110° et même 120°.

D'autre part, on sait, que des ptomaïnes comme les névrines, subissent du fait de la chaleur, une transformation qui a pour effet d'en atténuer l'activité. L'atropine, l'aconitine, et nombre d'alcaloïdes végétaux sont également modifiés dans leurs propriétés par la température de 100° et l'eau.

On voit qu'il est assez malaisé de placer une barrière absolue et définitive entre les poisons alcaloïdiques et les toxines proprement dites. En somme, nombre de caractères différentiels sont plus apparents que réels. D'ailleurs, d'après A. Gautier (1), on passerait facilement et insensiblement d'un groupe à l'autre ; il existerait des toxines à la limite des deux classes de corps albuminoïdes et alcaloïdiques (2) ; et, d'autre part, les substances albuminoïdes pourraient être considérées comme des alcaloïdes faibles. Un grand nombre de toxalbumines enfin, ne seraient « le plus souvent que des ptomaïnes compliquées ou mal définies ».

(1) A. Gautier : *Les toxines microbiennes et animales.* p. 329, Paris 1896.

(2) Landolodi : *Sur les substances toxiqnes produites par la bactéridie charbonneuse.* C. R. Sté biologie, 1891, p. 632.

En raison même de toutes ces considérations d'analogies et d'ambiguïtés, le seul et simple nom de *toxine* ne doit pas désigner plus spécialement, comme on a une tendance à le faire, la classe des albuminoïdes toxiques. Il est susceptible de s'adresser à tous les principes toxiques dont la composition et les propriétés sont encore vagues et indéterminées, jusqu'au moment où ces dernières, mieux définies, dévoileront leurs affinités, et permettront de les rattacher soit aux toxines alcaloïdiques ou ptomaïnes ; soit aux toxines albuminoïdes ou toxines vraies, dont les toxines tétanique et diphtérique constituent jusqu'à présent deux types les meilleurs et les plus certains.

§ 2. LES MYCOSES ET LES TOXINES MYCOSIQUES.

On crut pendant longtemps, que tous les champignons qui constituaient le groupe des Mucédinées, n'étaient que de simples saprophytes ; mais bientôt on reconnut que certains d'entre eux se comportaient comme de véritables parasites, envahissant les êtres vivants et y causant des désordres appréciables parfois suivis de mort. C'était là, des agents infectieux dont l'importance n'échappa à personne.

On attribue à Réaumur la première relation concernant la présence de moisissures dans un organisme vivant ; en 1749 il en signale l'existence dans des œufs en incubation. Plus tard, les parasites du muguet et du favus sont entrevus successivement par Remak (1837) et Shönlein (1839); mais, c'est surtout à Grüby que l'on doit d'avoir fait faire de sérieux progrès à la question des mycoses (1841 à 1844). Avec Robin et Virchow (1856) on isole les champignons; on les cultive, on les détermine, et on étudie les lésions qu'ils occasionnent.

Vers 1870, Grohe puis Block réalisent quelques mycoses expérimentales. La théorie saprophytique était définitivement ruinée; il y avait réellement des types d'allure nettement parasitaire, capables de produire des accidents sérieux chez les organismes infestés.

La mise au point par plusieurs savants, de l'actinomycose et de l'oïdiomycose, les magistrales études de Rénon sur l'aspergillose ont encore élargi ces conceptions et donné à l'étude des mycoses une sérieuse impulsion qui se manifeste encore actuellement.

Non seulement on apprenait que certains parasites évoluaient à l'intérieur des organes les plus profonds, mais encore que quelques-uns étaient capables de provoquer des lésions redoutables, et de déterminer des maladies comparables en apparence à certains grands fléaux bactériens, comme la tuberculose par exemple. On conçoit que leur étude ait souvent préoccupé l'esprit des mycologues.

Aujourd'hui, les mycoses ont pris une place considérable dans le domaine scientifique ; elles apparaissent comme des affections des plus sérieuses et doublées d'un mécanisme infectieux encore mal connu. Si certaines d'entre elles, assez bénignes, n'intéressent le plus souvent que des organes superficiels ou de peu d'importance, il en est d'autres qui affectent plus amplement la vitalité de l'être, et déterminent des accidents graves, parfois suivis de mort.

Telles sont entre autres : l'aspergillose pulmonaire et l'actinomycose iléo-cœcale.

La gravité de ces mycoses n'a pas échappé aux observateurs qui se sont alors efforcés d'approfondir leur mécanisme infectieux. On s'est souvent demandé, si dans les lésions qu'il détermine, le parasite mycélien n'évolue pas suivant le même mode que la bactérie type ; c'est-à-dire en empoisonnant de ses toxines l'organisme infesté.

Si le fait est démontré en ce qui concerne l'infection bactérienne, il ne l'est pas encore au même point pour l'infection mycosique, qui s'est jusqu'ici montrée plus réfractaire aux investigations de cette nature.

Jusqu'à ces derniers temps, le groupe des mycoses a semblé différent de celui des bactérioses. Il paraissait que le champignon agit localement sans entraîner de phénomènes généraux par sécrétion de poison, comme cela semble se passer encore pour les teignes. La théorie mécanique de l'infection semblait devoir à elle seule expliquer suffisamment les troubles morbides accompagnant l'infection mycosique. Les éléments du champignon agissant mécaniquement, provoqueraient par traumatismes directs ou indirects, la dissociation des éléments histologiques, l'irritation et la nécrose des tissus ; et cette action aurait pour conséquence d'amener des troubles sérieux dans le fonctionnement des organes les plus indispensables.

C'est encore l'opinion émise par Bodin en 1902 : « Jamais, en quelque sorte que ce soit, dit-il, (1) on ne voit la mycose pure évoluer avec cette allure toxique qui est un des caractères de la plupart des maladies bactériennes. Cela revient à dire que le champignon qui agit

(1) Bodin : *Les champignons parasites.* Masson. Paris, 1901.

par lui-même au point où il se développe, n'y sécréte pas de toxines susceptibles de diffuser dans l'organisme et d'en altérer les éléments. »

Nous verrons en effet, comment l'aspergillose, mycose dont la sévérité est des plus incontestables, n'avait jamais permis jusqu'alors, à l'observation, de déceler un poison actif sur les animaux sensibles au parasite spécifique.

Cependant, les symptômes que présentent les animaux à la suite de mycoses expérimentales ou naturelles, apparaissent parfois avec une telle soudaineté et une telle violence, qu'il semble y avoir autre chose qu'une action mécanique à incriminer dans l'infection. D'autre part, dans ces dernières années, Bodin et Savouré (1) ont étudié les lésions anatomiques causées par les champignons parasites chez divers animaux. Ils ont observé que, lorsque la spore germe au sein des tissus, il se produit une altération considérable des cellules avoisinantes. Il se forme une zone de dégénérescence épaisse de deux à trois couches de cellules, dans lesquelles le protoplasme se creuse de vacuoles, et le noyau se fragmente. Ces lésions de dégénérescence sembleraient indiquer une sécrétion parasitaire dont l'action directe se manifeste localement ; mais, qui pourrait peut-être, si elle est portée par le sang jusqu'aux centres nerveux, avoir un retentissement plus grand sur l'économie.

Il y a tout lieu par conséquent de songer à l'élaboration possible d'une toxine au sein de l'organisme par le cryptogame infectieux. Des recherches récentes, (2) sont venues confirmer cette assertion ; et la théorie mécanique fortement battue en brèche, a perdu considérablement de son importance. Il résulte de ces recherches exposées plus loin, qu'il faut compter dans les mycoses comme dans les bactérioses sur l'intervention de poisons agissant au moins localement.

C'est dans cette voie, déjà largement explorée cependant, que j'ai pu obtenir de modestes résultats, qui tendent encore à restreindre la distance qui sépare les deux infections, bactérienne et mycosique.

Mais il est de mon devoir de rappeler les travaux d'une foule d'expérimentateurs qui ont cherché à révéler l'existence de toxines mycosiques, et de rendre hommage à leurs laborieux efforts. Un aperçu historique de la question ne devra pas ici, se borner à une simple exposition des faits ; il importe de donner quelques renseignements sur les méthodes et les techniques employées, afin de montrer

(1) Bodin et Savouré : *Recherches expérimentales sur les mycoses internes.* — Arch. de parasito, t. VIII, p. 110, 1904.

(2) Recherches de Concetti, Ceni et Besta, Auclair, Bodin et Gautier, etc.

comment, dans certains cas, malgré des résultats négatifs, le but fut souvent près d'être atteint.

C'est à ma connaissance, à Kotliar (1) qu'il faut remonter pour rencontrer une tentative sérieuse de recherche de toxines dans les champignons pathogènes.

Kotliar, en 1894, essaie d'élucider le mécanisme de l'infection mycosique et se pose la question de savoir, si comme les infections bactériennes, la pseudo-tuberculose aspergillaire est le résultat d'un empoisonnement de l'organisme par une toxine. Il expérimente sur des *pigeons*, sachant cette espèce tout particulièrement sensible à l'aspergillose et emploie le liquide de Raulin comme milieu nutritif. Les pigeons recevaient dans le torrent circulatoire, un c.c. 1/2 à trois c.c. de liquide d'une culture stérilisée à une température convenablement choisie pour que le végétal soit seul détruit. Les pigeons survivaient tous à l'expérience, tandis que les témoins, inoculés avec les mêmes doses de cultures virulentes, succombaient.

Kotliar jugeant que cette méthode de stérilisation pouvait avoir détruit les produits solubles susceptibles d'exister, eut recours à la filtration du liquide de culture au travers d'un triple filtre de papier stérilisé ; de cette façon, les cellules et les spores mycéliennes se trouvaient retenues d'une façon suffisante, et il ne pouvait venir à l'idée de songer à une destruction des toxines.

Les *pigeons* étaient inoculés avec une culture de *cinq jours* (2). Les uns succombaient ; c'était ceux qui avaient reçu en même temps que le liquide de culture, quelques spores échappées à la filtration et ayant germé dans l'organisme, ainsi que l'autopsie le faisait constater. Les autres restaient indemnes ; c'était ceux qui avaient reçu un liquide exempt de spores ou à peu près.

En substituant au Raulin un bouillon peptonisé, les résultats furent purement négatifs. La conclusion de Kotliar est la suivante :

D'une façon générale, l'*Aspergillus fumigatus* ne forme pas de toxines dans les milieux dans lesquels on le cultive ordinairement.

En 1895, Charrin et Ostrowsky (3) étudient les désordres morbides causés par une levure : l'*Oïdium albicans*, agent de l'infection connue sous le nom d'oïdiomycose ou muguet. Ils constatent que les effets

(1) Kotliar : *Contribution à l'étude de la pseudo-tuberculose aspergillaire.* — Ann. de l'Inst. Pasteur, p. 179, 1894.

(2) On verra plus loin comment l'âge de la culture, la dose employée, et l'animal choisi, mettaient l'auteur dans l'impossibilité de vérifier avec sa méthode, le pouvoir toxique des cultures.

(3) Charrin et Ostrowsky : *L'oïdium albicans agent pathogène général.* C. R. Ac. des Sc., t. CXX, p. 1234, 1895.

traumatiques assez importants causés par ce champignon, sont accompagnés de légères perturbations dues à ses propres sécrétions. Mais, le bouillon de culture filtré doit, pour amener la mort de l'animal, être employé à des doses considérables (30 à 40[cc] par kilogramme d'animal).

Avec de petites quantités on ne provoque guère que des élévations de température.

La même année, Rénon (1) reprend l'étude des toxines chez l'*A. fumigatus* ; et comme Kotliar avait démontré l'absence de produits solubles toxiques extra-cellulaires, il entreprend de voir si de tels produits ne résident pas à l'intérieur du mycélium. Pour cela, il utilise une culture d'*Asp. fumigatus* sur maltose, et dissout le mycélium dans une solution aqueuse de potasse ; il soumet ensuite cette solution à la dialyse, puis, inocule avec le liquide du dialyseur, deux *pigeons* dans le muscle pectoral. L'un avait reçu 5 c.c., l'autre 10 c.c. ; ils ne succombèrent pas.

Une autre portion du même liquide fut précipitée par l'alcool ; le précipité recueilli est dissout dans de l'eau physiologique et injecté à la dose de 4 et de 6 c.c. dans le muscle pectoral de deux *pigeons* ; les animaux résistèrent. Rénon conclut qu'il n'existait pas plus de toxines intra-cellulaires, qu'extra-cellulaires.

La même année, (1895) Déléarde (2) entreprend de déterminer l'action des produits solubles de l'*Actinomyces bovis*, agent de l'actinomycose, sur le lapin et le cobaye. Les cultures faites sur bouillon glycériné, et filtrées au papier, n'occasionnent rien de grave aux animaux, en injections sous-cutanées.

Déléarde observe seulement avec 10 c.c. et pendant les 24 heures qui ont suivi l'injection, une hypothermie de un degré pour le lapin, de 1/10[e] de degré pour le cobaye.

En injection intra-péritonéale, l'action est plus nocive : six cobayes meurent de cachexie ; en injection intra-veineuse, l'action est nulle ; il ne se produit aucune réaction thermique. Mais, la mort des animaux étant survenue à des époques très éloignées de l'inoculation, (un mois et plus) et les symptômes observés étant insignifiants, Déléarde conclut que l'*Actinomyces*, à l'inverse de nombreux microorganismes pathogènes, n'est pas dangereux par les produits qu'il sécrète.

En 1896, la question toxicité des liquides de culture d'*Aspergillus fumigatus* est reprise par Lucet (3). Comme ses prédécesseurs, Kotliar, Rénon, il se heurte à un insuccès, et n'obtiend pas de résultats sensi-

(1) Rénon : *Essais d'immunisation contre la tuberculose aspergillaire.* C. R. Sté de Biologie, 20 juillet 1895.

(2) Déléarde : *Contribution à l'étude de l'actinomycose.* Thèse de Lille, 1895.

(3) Lucet : *Etude expérimentale et clinique sur l'Aspergillus fumigatus.* Bull. Soc. centle de méd. vétérinaire. p. 585, 1896.

blement plus heureux. Il fait cependant cette importante constatation : « l'*Asp. fumigatus* donne naissance à des produits nouveaux indéterminés, qui augmentent encore l'infertilité du milieu nutritif, et lui communiquent en outre une action pyrétogène assez marquée ».

Dans une autre série d'expériences, Lucet employait le liquide de Raulin provenant d'une culture âgée d'un mois. Deux lapins en reçurent deux cent. cubes, l'un en inoculation intra-veineuse, l'autre dans le tissu sous-cutané. Dans un cas comme dans l'autre, Lucet ne put observer qu'une légère élévation de la température rectale.

Ces résultats, d'après l'auteur, se trouvaient cependant en contradiction avec ceux de Kotliar, qui, d'une série de recherches faites sur les *pigeons,* avait conclu que l'*Asp. fumigatus* ne produit pas de toxines dans les milieux dans lesquels on le cultive ordinairement, parce que ses sujets ne mouraient pas sous l'influence d'une injection de liquides résiduels de ses cultures. Il se peut en effet, ajoute Lucet, « si sensible que soit le pigeon à l'*Asp. fumigatus,* que les toxines auxquelles donne naissance la culture de cette Mucédinée soient insuffisantes à elles seules, pour provoquer la mort d'un de ces oiseaux à qui on les injecte, et que cependant elles existent, et soient capables de déterminer un malaise passager accusé seulement par des variation thermiques ».

On voit que Lucet soupçonnait déjà, dans les liquides de culture de l'*Asp. fumigatus*, l'existence de substances toxiques, qui dans les conditions où il opérait, ne se révélaient que par un certain pouvoir pyrétogène.

Son observation et ses déductions se sont trouvées confirmées dans la suite, et plus loin je montrerai combien il s'est approché près de la vérité.

En 1896, Ostrowsky (1) remet à jour quelques faits concernant la toxicité des produits solubles sécrétés par l'*Oïdium albicans*; il indique leur puissance thermogène et leur faible toxicité déjà signalée. Ses investigations dans le domaine de la pathogènie lui font croire que le muguet se sert médiocrement de ses sécrétions.

En 1897, Rénon (2) dans son magistral ouvrage sur l'aspergillose, rassemble tout ce qui a été dit sur cet important chapitre des mycoses. Sa conclusion est formelle : « D'une façon générale l'*Aspergillus fumigatus* ne forme pas de toxines extra-cellulaires dans les milieux sur lesquels on le cultive ordinairement, et pas non plus de toxines intra-cellulaires ; ou du moins, s'il existe des produits toxiques dans

(1) Ostrowsky : *Les infections bactériennes. Recherches sur l'oïdiomycose.* Thèse de Paris, 1896.
(2) Rénon : *Etude sur l'aspergillose chez l'homme et chez les animaux.* Masson. Paris, 1897.

le mycélium, ceux-ci sont aussi incapables de tuer les animaux que de les prémunir contre une nouvelle intoxication ».

Obici (1), en 1898, ne réussit pas également à déceler une toxine dans l'*Asp. fumigatus*.

En 1900, Luigi Concetti (2) étudie la question des toxines oïdiennes déjà ébauchée par Charrin et Ostrowsky. Il établit que les filtrats de culture n'ont qu'une très faible action marastisque non spécifique, et que la propriété pathogène de l'*Oïdium* ne saurait être due à des poisons extra-cellulaires. Mais, son protoplasma renferme des substances toxiques ou substances oïdiennes, qui persistent dans les cellules tuées par la chaleur, le chloroforme, le formol, etc... D'après Concetti, les cellules oïdiennes triturées et centrifugées, se séparent en deux couches ; la couche supérieure, formée de protoplasma protéique et des subtances grasses constitue l'oïdine supérieure (OS) ; la couche inférieure, contient les fragments de la membrane et une partie du protoplasme ; c'est l'oïdine résiduelle (O R). Concetti a vu que la OS renferme la protéine oïdienne avec son pouvoir pathogène général et reproduit les accidents dûs au muguet. La O R, au contraire, renfermerait une substance immunisante et peut-être curative, qui dans l'organisme vivant, donnerait naissance à une antitoxine.

En 1902, Ceni et Besta (3) trouvent dans les spores d'*Asp. fumigatus* et *d'Asp. flavescens* une substance qui, injectée à l'animal, détermine des symptômes identiques à ceux que produisent l'injection de spores ; mais ils n'étudient qu'un petit nombre de propriétés de cette substance, qu'ils retirent des spores au moyen de l'alcool ou de l'éther. Ils rapprochent alors les effets obtenus par ce poison de ceux de la pellagre, maladie sévissant surtout parmi les populations qui se nourrissent de maïs avariés, dans lesquels se trouvent des spores de l'*A. fumigatus*. Mais les auteurs restent muets sur un grand nombre de points ; ils ne donnent aucune indication sur les inoculations de ce poison aux divers animaux, sur les voies d'inoculation, sur ses propriétés immunisantes, etc...

Roger (4), en 1902, revient sur la question des toxines oïdiennes, et indique le résultat des recherches qu'il a entreprises sur ce sujet. Dans ses expériences, il ne filtre pas les cultures, mais il les stérilise par la chaleur ; il injecte ainsi à la fois, les toxines contenues dans le végétal

(1) Obici : *Ueber die pathogenen Eigenschaften des A. fumigatus.* (Beitrage z. path. anat und z) allg. path., p. 197, t. XXIII, 1898.

(2) Concetti : *Archives des maladies des enfants.* 1900.

(3) C. Ceni et Besta : *Ueber die Toxine von Asp. fumigatus und Asp. flavescens, und deren Beziehungen zur Pellagra.* Centralblatt für allg. Path. und path. Anatomie, t. XIII, p. 930. 941, Déc. 1902.

(4) Roger : *Les maladies infectieuses.* Masson, Paris. 1902.

et celles que peut renfermer le liquide de culture. Il a constaté que la toxicité croît avec la virulence de l'échantillon employé. Douze cent. cubes de liquide d'une culture peu active, ne produisent aucun trouble ; tandis que cinq cent. cubes de liquide d'une culture dont la virulence a été exaltée, amènent la mort. Le rôle du poison oïdien semblait démontré.

La même année, Neisser (1) publie les expériences de Plato. Ces expériences ont trait à une substance extraite des cultures de Trichophytons et désignée sous le nom de *trichophytine*. Plato obtient cette substance bien simplement. Il fait des cultures sur bouillon de viande additionné de 3 °/₀ de maltose ; après 2 à 3 mois de séjour à l'étuve, le mycélium est dilacéré le mieux possible, et cette bouillie est filtrée au papier ; le filtrat est additionné de 0,25 p. 100 d'acide phénique.

Cette trichophytine injectée à des animaux sains ne produit aucun symptôme ; injectée à des hommes trichophytiques, elle n'occasionne de symptômes anormaux que chez ceux dont la trichophytie est profonde. En trois cas, l'auteur a noté une élévation de température et, quelquefois, une réaction générale intense.

Une *favine* préparée de la même façon avec les champignons du favus n'a donné aucune réaction, ni chez les faveux ni chez les teigneux.

En 1903, Barthelat (2) entreprend sur les Mucorinées des recherches semblables à celles de Kotliar et de Lucet sur l'*Asp. fumigatus*. Il opère avec le *Mucor corymbifer*, et il extrait par trituration du mycélium, un liquide épais qu'il filtre à la bougie. Il en injecte 1^{cc},2 dans la veine auriculaire d'un lapin de 2100 gr. Il ne peut constater qu'un léger abattement et un faible amaigrissement de l'animal.

D'après Barthelat, il ne semble pas exister de produits solubles intra-cellulaires bien actifs chez le *Mucor corymbifer*, ou bien ils seraient retenus par la bougie ; en tout cas, leur toxicité est nulle à l'égard des lapins.

En 1903 (3), Auclair fait connaître le résultat de ses recherches sur les poisons microbiens. Il obtient, avec le champignon, de l'actinomycose un extrait éthéré qu'il appelle *éthéro-actinomycétine* et qui, injecté à la dose de 5 à 6 milligr., sous forme d'émulsion dans le tissu sous-cutané d'un lapin, produit quelques lésions, surtout au point d'in-

(1) Neisser : *Archiv für dermat. und syph.*, vol. LX, fasc. I, 1902.

(2) J. Barthelat : *Les mucorinées pathogènes et les mucoro-mycoses chez l'homme et chez les animaux*. Thèse médecine. Paris. 1903.

(3) Auclair . *Recherches sur les poisons microbiens*, Arch. de méd. expérimentale, p. 725. 1903.

troduction. De cette étude, Auclair a déduit la loi suivante : que les désordres locaux, ou mieux, l'inflammation provoquée par les microbes pathogènes n'est pas due à l'activité biologique de ces microbes ; elle est le résultat, en partie tout au moins, de poisons chimiques intimement adhérents aux corps microbiens, et insolubles dans le milieu physiologique.

La même année (1903), la question des toxines de l'*A. fumigatus* est de nouveau reprise. Macé (1) est amené à penser, par ses propres expériences, que l'action traumatique exercée par les conidies d'*Aspergillus fumigatus* est doublée d'une action toxique qui accroît la nocivité de l'agent pathogène ; mais ses essais pour isoler le poison sont vains. Comme la plupart de ces prédécesseurs, il a choisi le *pigeon* comme animal d'expérience.

En 1904, Truffi (2) reprend les expériences de Plato sur la trichophytine, et arrive aux mêmes conclusions que lui. Ses recherches établissent en outre que la trichophytine conserve son efficacité, même après avoir été chauffée à 120°, et que son principe actif est soluble dans l'alcool absolu. La propriété de produire des substances amenant les mêmes réactions est partagée aussi par les Microsporums, quoique à un degré moindre.

La valeur curative de la trichophytine est très restreinte ; au contraire, son importance diagnostique est évidente. Les bouillons de culture de l'*Achorion*, agent de la teigne faveuse, ne déterminent pas d'effets de réaction dans les trichophyties.

En 1905, Ceni et Besta (3), reprenant leur étude sur la genèse de la pellagre, expérimentent avec du maïs infesté par l'*Aspergillus niger*. Ils traitent les cultures du champignon de la provenance indiquée, par l'eau et l'alcool, et ils obtiennent des extraits assez toxiques, provoquant des troubles voisins de ceux produits par la culture.

Les récentes recherches de H. Verliac (4) sur les toxines de l'*Actinomyces* lui permettent de conclure à l'absence de produits solubles toxiques spécifiques, dans les milieux usuels de culture ; mais, en revanche, elles lui ont révélé la présence dans le corps du champignon, d'une substance toxique qui reproduit les lésions que provoque l'ino culation du parasite, vivant ou mort.

(1) Macé : *Etude sur les mycoses expérimentales*. Thèse. Pa is. Mai 1903.

(2) Truffi. *Clinica médica italiana*. p. 377. Juin 1904.

(3) Ceni et Besta : *Die pathogenem Eigenschaften des Asp. niger mit Bezug auf die Geneses de Pellagra*. Ziegler's Beitrag. z path. Anat ü z allg. Path. t. xxxvii, f. 3. p. 578. 1905.

(4) H. Verliac : *Recherches expérimentales sur les toxines de l'actinomycose*. Thèse de Paris, 14 Février 1907.

Tout dernièrement, MM. Poncet, Lacome et Thévenot (1) concluent de leurs recherches sur la toxicité des cultures d'*Actinomyces*, que le champignon de l'actinomycose n'abandonne pas de produits solubles toxiques, et que les accidents relèvent de poisons fabriqués par les tissus eux-mêmes, qui réagissent en présence du champignon.

En définitive, la toxicité appartiendrait à l'*Actinomyces* lui-même, et non à son bouillon de culture; et, cette toxicité n'aurait pas seulement pour agent l'éthéro-actinomycétine de Auclair, étudiée par Verliac, laquelle ne détermine que des lésions locales transitoires ; mais elle serait due surtout à des produits de réaction élaborés par l'organisme pour sa propre défense.

Cet ensemble de recherches, faites dans le but de déceler des produits toxiques chez les principaux champignons pathogènes, révèle çà et là, la présence de substances capables de produire certaines réactions plus ou moins vives quand on les inocule aux animaux, et permet, dans une certaine mesure, un commencement d'assimilation des infections bactériennes et mycosiques.

Mais, les faits présentés ne sont pas tous aussi probants et aussi décisifs les uns que les autres ; beaucoup d'expériences n'ont pas eu le résultat espéré, et sont allées quelquefois même, à l'encontre de l'hypothèse. Seuls, les résultats obtenus par Charrin, Ostrowsky, Concetti, Roger, relativement à l'oïdiomycose, peuvent entrer en ligne de compte ; ils établissent une certaine relation entre le muguet et quelques affections bactériennes, relation confirmée par des recherches d'un autre ordre.

L'éthéro-actinomycétine de Auclair jouit de propriétés nocives peu accusées ; la trichophytine de Plato et de Truffi est une substance bien peu active. Ce sont là des substances provoquant des réactions locales, et non un empoisonnement rapide et intégral de l'organisme.

Chez les Mucorinées, il faut noter l'absence de produits toxiques dans les liquides de culture.

En ce qui concerne l'existence certaine d'une toxine chez l'*Aspergillus fumigatus*, les recherches ont échoué malgré l'incontestable autorité de ceux qui les ont tentées. Nous ne relevons que l'observation de Ceni et Besta capable de faire entrevoir l'existence d'une toxine. Encore est-il, que les auteurs, après avoir décélé un poison dans les spores du champignon, ne s'appliquent pas à le caractériser, ayant surtout en vue l'étude de la genèse de la pellagre.

(1) A. Poncet, Lacome et Thévenot : *Recherches sur la toxicité des cultures d'Actinomyces et la présence de leurs produits solubles.* Communic. à l'Ac. de méd. 16 Avril 1907.



Comme on le voit, les documents relatifs aux *toxines mycosiques* étaient assez dignes d'intérêt pour être rassemblés et exposés ici. Ils représentent un bagage de connaissances encore assez peu approfondies pour laisser à l'expérience un champ libre et vaste à parcourir.

CHAPITRE II

Production d'une toxine par l'Aspergillus fumigatus

Nouvelles recherches expérimentales sur la toxicité de ses liquides de culture.

§ 1. NOTIONS ÉTIOLOGIQUES ET CLINIQUES SUR L'ASPERGILLOSE.

On désigne sous le nom « d'aspergillose pulmonaire » ou encore de « tuberculose aspergillaire » une affection occasionnée par quelques Aspergillus pathogènes, et notamment par l'*Asp. fumigatus*.

Les mycoses aspergillaires affectent divers animaux, rarement l'homme. Dans son traité de l'Aspergillose, Rénon fait l'historique complet de la question, et signale les observations nombreuses et intéressantes faites à ce sujet, ainsi que les cas curieux observés par lui-même. Je me bornerai à donner quelques brèves indications de cette grave affection mycosique.

La cause de l'infection réside dans les graines ou les farines souillées par des poussières où se trouvent des spores d'*Asp. fumigatus*.

La maladie s'observe plus particulièrement chez les personnes que leur profession oblige au maniement des substances ainsi contaminées. Ce sont surtout les gaveurs de pigeons et les peigneurs de cheveux. On pensait d'abord que la contamination de l'homme avait lieu par les pigeons ; mais il est reconnu aujourd'hui que l'infection de l'homme et de l'oiseau se fait par les graines porteuses de spores d'Aspergillus.

Chez l'homme, l'*Asp. fumigatus* peut affecter divers organes, l'oreille, la cornée, le rein, la peau, mais surtout l'appareil respiratoire. Là, le parasite trouve des conditions particulièrement favorables à son développement.

Les débuts de l'affection présentent au point de vue diagnostic, les

mêmes symptômes que la tuberculose vraie : toux, hémoptysies, expectorations verdâtres, amaigrissement etc. L'observation anatomique rappelle encore mieux, si c'est possible, les désordres de la tuberculose bacillaire chronique, par la formation de tubercules et la naissance de quelques lésions bronchiques.

« L'aspergillome », ou tubercule aspergillaire, présente une grande analogie avec celui de la tuberculose vraie. Comme lui, il a son siège dans le poumon, et ses caractères histologiques sont les mêmes.

L'aspergillose constitue ainsi une affection tuberculiforme qui lui a fait mériter le nom de « tuberculose aspergillaire ».

La maladie évolue de différentes façons ; tantôt elle disparaît d'elle-même, tantôt elle se poursuit et se complique quelquefois d'une tuberculose vraie ; celle-ci évolue alors pour son propre compte, et reste la seule cause des accidents consécutifs et de la mort. Le traitement de l'affection n'est guère régi que par une médication d'ordre général.

Les oiseaux sont plus particulièrement sensibles à l'action de l'A. F. L'aspergillose spontanée est chez eux assez répandue, et s'observe le plus souvent chez le pigeon, la poule, le canard, l'oie. La température élevée des oiseaux, la présence de sacs pulmonaires, sont autant de causes qui favorisent le développement du parasite. Là encore, les lésions sont essentiellement tuberculeuses ; les animaux atteints meurent assez rapidement.

L'aspergillose peut être reproduite expérimentalement avec la plus grande facilité, et les lésions, ainsi que les symptômes atteignent un degré plus accusé que dans l'aspergillose spontanée.

Les animaux qui contractent aisément la maladie, sont également ceux qui se montrent le plus sensibles à l'aspergillose expérimentale ; les oiseaux, et en particulier le pigeon, sont tout désignés pour servir d'animaux d'expérience. Le lapin, le cobaye, sont également sensibles, quoique moins que le pigeon ; le chat et le chien semblent plus réfractaires.

L'infection expérimentale se fait par diverses voies : sous-cutanée, intra-veineuse, intra-péritonéale, trachéale, intra-digestive, etc. Les effets obtenus varient avec les animaux choisis, avec le mode d'inoculation, et avec les doses employées.

§ 2. CONSTATATION DU POUVOIR TOXIQUE DES LIQUIDES DE CULTURE DE L'*Aspergillus fumigatus*.

INOCULATIONS A DIVERS ANIMAUX.

Au cours de mes recherches sur les ferments solubles des champignons pathogènes, j'ai été conduit plus rapidement que je me le proposais, à l'étude de la toxicité des liquides de culture de ces espèces cryptogamiques.

Ayant voulu rechercher si les ferments solubles étudiés ne donnaient pas naissance dans l'organisme animal à des antiferments, je m'étais adressé pour cela, au liquide de culture de l'*Aspergillus fumigatus*, tel qu'il a été composé pour les essais précédents.

Quinze cent. cubes de ce liquide étaient injectés sous la peau d'un lapin ; avant même de procéder à une seconde inoculation, le lapin fut trouvé mort dans sa cage au lendemain de l'opération. Cette mort me sembla accidentelle. Après tout ce qui avait été dit et affirmé sur l'absence de toxine dans les liquides de culture de cette espèce pathogène, et ignorant encore les recherches de Ceni et Besta, je ne pouvais guère songer à la possibilité d'une mort par intoxication. Mais, ces accidents se renouvelant à chaque tentative d'incculation, je résolus de recommencer l'opération en ayant soin de surveiller l'animal. Ce dernier, au bout de quelques minutes, manifesta des symptômes d'une intoxication violente, symptômes décrits plus loin, et qui firent songer de suite à une toxine contenue dans le liquide de culture.

Afin de voir si la toxicité du liquide employé était bien due uniquement à la présence d'une substance soluble élaborée par le végétal, et pour caractériser nettement ce poison, il devenait indispensable d'entreprendre une suite d'expériences rigoureuses ; ce sont ces expériences qui sont exposées dans la suite.

Le liquide de culture employé est celui qui a été choisi dans la première partie de ce travail, pour la recherche de quelques diastases ; il a la composition suivante :

Eau	100
Glucose..................	3
Peptone................	1

Toutes les cultures se sont développées à la température de 30°. J'ai successivement expérimenté avec le lapin, le cobaye, le rat blanc, la souris, le chat, le chien, pour connaître leur réceptivité à l'égard du poison, en me servant des diverses voies d'inoculation.

LAPIN

Inoculation sous-cutanée. — EXPÈR. I. — Un lapin de 1 kil. 060 reçoit en injection sous-cutanée 15 c.c. de liquide d'une culture de 16 jours, filtré à la bougie Garros.

Pendant 15 à 20 minutes, l'animal ne paraît nullement incommodé ; mais au bout de ce temps, il devient inquiet, se tient immobile dans un coin de sa cage et ne tarde pas à être pris d'un tremblement, d'abord léger, qui s'accentue rapidement, et s'accompagne d'une grande fréquence de la respiration. Il n'y a pas cinq minutes que ces troubles ont débuté, que l'animal de plus en plus anxieux, de plus en plus tremblant, s'allonge sur le sol les oreilles tombantes, comme si ses membres refusaient de le porter. Puis, tout-à-coup, 25 à 45 minutes après l'injection, le lapin se redresse, s'élance en avant, ou au contraire, présente un brusque mouvement de recul, et subitement, tombe sur le flanc, en proie à un violent accès tétanique. Le trismus est intense, les yeux saillants, l'opisthotonos ramène la tête en arrière, les pattes sont allongées et raides. Cet accès dure quelques secondes et fait place à des mouvements convulsifs, caractérisés par une agitation des membres, de telle sorte que l'animal, toujours couché sur le flanc, paraît battre du tambour avec ses pattes de devant, ou d'autres fois, offre des mouvements plus rythmés, analogues à ceux du galop.

Après quelques instants, survient un nouvel accès tétanique analogue au premier, avec opisthotonos, emprosthotonos ou pleurosthotonos et suivi, comme la crise initiale, de mouvements convulsifs.

La température rectale, qui était de 36° quatre heures après l'injection, tombe à 32° six heures après. Les symptômes signalés s'aggravent et persistent pendant 4 à 6 heures ; ils aboutissent à un état comateux, dans lequel l'animal, insensible, n'offre plus qu'une sorte de trémulation des membres, avec quelques contractions toniques qui amènent rapidement la mort.

Le lapin, inoculé à onze heures et demie du matin, meurt dans la nuit. A l'autopsie de l'animal, on ne remarque qu'une congestion du poumon, un peu d'œdème gélatiniforme au point d'inoculation avec pétéchies ; rien ailleurs.

Expér. II. — Un lapin de 1 kil. 855 reçoit, par voie sous-cutanée, 10 c.c. de filtrat d'une culture âgée de 15 jours. Au bout de 20 minutes, on note les symptômes habituels : convulsions, paralysie, etc..

Expér. III. — Un lapin de 1 kil. 968 reçoit 10 c.c. d'un filtrat d'une culture de 13 jours. Pendant plusieurs heures, il présente les phénomènes convulsifs et paralytiques habituels ; mais il résiste, et le lendemain il est rétabli. Au bout du sixième jour, il est redevenu normal, quoique notablement amaigri. Il n'avait pas reçu la dose mortelle.

Expér. IV. Un lapin de 1 kil. 830 reçoit 10 c.c. du même liquide *soumis un certain temps à la température de 110°* à l'autoclave. Il n'a présenté aucun symptôme grave.

Ces premières expériences invitaient à rechercher la dose mortelle, et à préciser l'action de la température ; c'est ce qui sera fait dans un paragraphe ultérieur. Toutefois, j'ai pu remarquer que, même au-dessous de la dose mortelle, l'inoculation détermine encore des crises tétaniques et convulsives plus ou moins violentes, qui durent de trois à cinq heures, puis s'espacent et disparaissent complètement. Au bout de 18 à 20 heures, l'animal semble revenu à son état normal.

Inoculations intra-péritonéales. — Expér. V. — Un lapin de 1 kil. 830 reçoit dans le péritoine 15 c.c. de liquide d'une culture de 24 jours : on observe les accidents habituels : tremblements, puis subitement, convulsions tétaniques intenses, suivies d'une période de paralysie. Les accès deviennent de plus en plus rapprochés et de plus en plus violents ; l'animal meurt le lendemain matin.

Inoculations intra-veineuses. — Le tableau est plus dramatique encore que ceux que l'on vient d'exposer, si l'on procède à l'inoculation par la voie veineuse (1) ; les accidents sont alors immédiats.

Expér. VI. — Un lapin de 1 kil. 255 reçoit dans une des veines de l'oreille 9 c.c. d'un liquide de culture de 16 jours. Les accidents apparaissent immédiatement. A peine les dernières gouttes s'échappent-elles de la seringue que déjà, l'animal glisse sur la table d'opération, ses pattes fléchissent, refusant de le porter, et en trois minutes, l'animal tombe tétanisé, en proie à des tremblements convulsifs extrêmement

(1) L'inoculation intra-veineuse au lapin se pratique commodément de la façon suivante :

On choisit la veine marginale postérieure de la face dorsale de l'oreille. Cette veine est ordinairement apparente ; elle fait saillie normalement, et davantage encore, quand on la comprime en un point. Après avoir de quelques coups de rasoir, dénudé le point d'inoculation, on enfonce dans la veine, la canule de la seringue de Pravas, laquelle, ainsi que le réservoir et le piston, ont été passés quelques minutes à l'eau bouillante. Le liquide s'écoule avec facilité dans la lumière du vaisseau et l'animal reste parfaitement immobile, ne paraissant nullement incommodé. Il n'en est pas de même lorsque la canule a dévié de sa direction première et a pénétré dans le tissu cellulaire avoisinant. On en est averti, car un œdème se produit alors au point au point d'inoculation, et le lapin, désagréablement affecté, fait des efforts pour s'échapper.

violents. La respiration est fréquente et irrégulière, l'animal pousse à plusieurs reprises des cris très perçants. L'état convulsif et paralytique persiste trois heures après l'inoculation ; à ce moment, l'animal meurt après quelques spasmes violents. Ce sont aussi, mais plus prompts à se manifester, les mêmes symptômes que ceux que j'ai décrits dans l'inoculation sous-cutanée. A l'autopsie, mêmes constatations.

Expér. VII. — Un lapin de 1 kil. 850 reçoit dans les veines, 13 c.c. d'un liquide de culture de 22 jours ; il est, comme le précédent, pris instantanément de tremblements ; en moins d'une minute, les convulsions apparaissent et, après de violentes contorsions, l'animal tombe sur le flanc, tétanisé ; la mort survient dans le coma.

L'inoculation par voie intra-cérébrale est exposée plus loin, en même temps que celles qui ont été tentées au cobaye.

Ces faits sont déjà assez clairs et assez probants pour permettre d'affirmer qu'il existe dans le liquide de culture de l'*Aspergillus fumigatus* (milieu glucosé peptonisé) un poison agissant sur les centres nerveux du lapin, et susceptible d'entraîner la mort en quelques heures quand on en injecte une certaine dose.

Après les inoculations au lapin, il était intéressant de rechercher l'activité du poison sur quelques autres espèces animales ; les unes, sensibles aux spores de l'*Asp. fumigatus* comme le cobaye et surtout le pigeon ; les autres, douées d'immunité naturelle vis-à-vis du champignon lui-même, comme le chat, qui, d'après Rénon offre une immunité naturelle certaine ; et le chien, insensible aux inoculations de fortes doses de spores, comme l'ont montré Rénon et Lucet.

COBAYE

Avec le cobaye, les résultats sont très analogues à ceux que l'on obtient avec le lapin ; mais la sensibilité au poison est moins grande que chez ce dernier. On a vu que la dose mortelle pour le lapin oscillait entre 5 et 6 c.c. de liquide pour 1000 gr. d'animal. Pour le cobaye de 400 gr. la dose mortelle est aussi élevée que pour un lapin de 1800 à 2000 gr., ainsi qu'il résulte des expériences ci-dessous.

Expér. VIII.— Une culture de 14 jours est filtrée à la bougie Garros et inoculée sous la peau de deux cobayes.

Le 1er pesant 430 gr. en reçoit 10 c.c.

Le 2e — 455 gr. — 15 c.c.

Ces animaux sont pris d'accidents, dix à quinze minutes après l'inoculation. Les accidents commencent par un tremblement généralisé qui

devient de plus en plus intense ; en même temps les cobayes poussent de petits cris. Au bout d'une demi-heure, des accidents plus graves d'ordre nerveux surviennent ; le tremblement fait place à des mouvements convulsifs intermittents avec des phénomènes de paralysie. Ces derniers prédominent sur les membres inférieurs, et semblent plus accusés du côté ou l'inoculation a été faite, si bien que l'animal ne se traîne plus qu'avec ses membres antérieurs. Au bout de trois quarts d'heure environ, la paralysie a augmenté ; les animaux sont incapables de se remettre sur leurs pattes ; celles-ci sont étendues et présentent une certaine raideur, avec un tremblement convulsif continuel. De temps en temps, il y a émission d'urine et de matières fécales. Après une heure de ces manifestations, les mouvements convulsifs s'espacent de plus en plus ; les cris deviennent rares ; un léger tremblement des membres persiste. Au bout d'une heure et demie, la température rectale chez les deux cobayes est de 32° 8 puis 32° 4 ; elle continue à s'abaisser sensiblement.

Mais, dans la suite, les phénomènes présentent une certaine divergence chez les deux cobayes.

Au bout de cinq heures, le cobaye n° 2 est plongé dans un état comateux ; il ne bouge presque plus, les troubles respiratoires sont des plus accusés, la température rectale diminue toujours ; et, d'heure en heure, on note les températures suivantes :

31° 1, 30° 4, 29° 3, 28° 2.

Enfin la mort survient dans le coma, 23 heures après l'inoculation.

Le cobaye n° 1 au contraire, semble s'améliorer au bout des 5 heures qui suivent l'inoculation. Il est encore paralysé ; cependant, il peut se relever et se traîner à l'aide des pattes antérieures ; il ne présente presque plus de mouvements convulsifs, mais il a encore de l'incoordination des mouvements.

La température rectale prise d'heure en heure, suit d'abord une marche décroissante, puis croît à nouveau pour atteindre son cours normal :

34°, 32° 8, 32° 6, 32° 1, 31° 5, 34° 4, 36° 9

Trente heures environ après l'inoculation, le cobaye est revenu à la normale, alors que le cobaye n° 2 a succombé. La dose présente donc déjà une influence très apparente sur l'état morbide du sujet.

Expér. IX. — Un cobaye pesant 280 gr. a reçu en inoculation *intra-péritonéale*, 15 c.c. de liquide d'une culture de 24 jours. Au bout de 15 à 20 minutes, on note comme chez le lapin, l'apparition d'un tremblement d'abord léger, dont l'intensité s'accroît rapidement. Trente à quarante minutes après l'injection, les manifestations graves apparaissent ; l'animal, qui se

tenait anxieux dans un coin, roule sur le flanc, tétanisé comme le lapin. Ses pattes lui refusent l'équilibre ; il essaie de s'en servir, mais en vain ; il tombe sur le côté gauche ou sur le droit, au gré de la pesanteur. L'accès tonique dure quelques secondes, et est suivi de mouvements convulsifs, avec agitation désordonnée des pattes.

Ce sont en somme, les mêmes symptômes que ceux que l'on observe à la suite des inoculations sous-cutanées ou intra-veineuses, tant au lapin qu'au cobaye : manifestations tétaniques, convulsives, paralytiques qui se succèdent avec quelques variations suivant les cas, et qui aboutissent en 10 ou 20 heures à la mort de l'animal si la dose injectée est suffisante, ou qui, après 4 à 6 heures, s'amendent et disparaissent sans laisser de traces si la dose est plus forte.

Inoculations intra-cérébrales. — Des inoculations par voie intra-cérébrale ont été essayées au lapin et au cobaye, dans le but d'observer si l'action est plus rapide ; mais les inoculations de ce genre sont très délicates, car des lésions traumatiques du cerveau accompagnent quelquefois les troubles dûs au toxique, et il n'est pas toujours commode de discerner les effets superposés. De plus, il est difficile d'inoculer au même point. Cependant, en pratiquant l'inoculation sur la ligne réunissant la commissure postérieure des yeux, et en enfonçant la canule à 2 m/m environ de la ligne médiane, perpendiculairement, on est plein hémisphère, et l'on évite d'amener la mort de l'animal par un autre effet que celui que l'on cherche. C'est à des variations dans les limites de l'inoculation que doivent être rapportés les symptômes anormaux qui sont apparus au cours des opérations suivantes :

Expér. X. — Un lapin de 1kg 630, reçoit dans le cerveau, 1 c.c. de liquide filtré, d'une culture de 23 jours. En une minute l'animal est en boule ; puis, brusquement il est pris de sauts en hauteur ; il retombe sur le flanc, et présente quelques convulsions. Au bout de quelque temps, il parvient à se remettre sur ses pattes, l'avant-train aplati. L'oppression est considérable ; de temps en temps des contractures dévient la tête du côté du point d'inoculation. Au bout de quatre heures, il est en boule, sans convulsions, et paraît revenir à la normale. Laissé en observation, il n'a rien présenté les jours suivants.

Expér. XI. — Un cobaye de 485 gr. reçoit en injection intra-cérébrale, 1 c.c. du même liquide de culture que le lapin précédent. Au bout d'une demi-minute, l'animal court tout autour de la salle, puis se met en boule et tombe tétanique. Pleurosthotonos et convulsions intermittentes dominent surtout. Les pattes antérieures sont animées d'un mouvement de va et vient comme pour nager ou fouir. L'animal reste ensuite sur le flanc et présente les mêmes

symptômes que dans le cas de l'inoculation sous-cutanée. Au bout de deux heures et demie, l'animal est tout aussi abattu et meurt dans la nuit.

Expér. XII. — Un cobaye de 512 gr. reçoit dans le cerveau, un demi cent. cube du liquide de culture qui a servi à l'expérience précédente ; au bout d'une demi-minute, il tourne en rond, puis tombe tétanique et meurt dans l'espace de deux minutes.

Ici, l'on a dû produire une lésion mécanique qui a entraîné une mort rapide, car les effets propres au poison s'exercent dans un laps de temps plus considérable et sont caractérisés d'une toute autre façon (Expér. XI).

Expér. XIII. — Un cobaye de 451 gr. reçoit de la même façon, un demi cent. cube du liquide *chauffé à 105°*. L'animal présente quelques convulsions, mais bientôt il se remet sur ses pattes et reste seulement comme étourdi, sans tétanos ni convulsions dans la suite. Les accidents observés ici semblent dûs à la toxine non entièrement détruite par la chaleur ; il n'y a pas superposition de troubles causés par des lésions mécaniques intéressant l'organe cérébral.

On voit qu'en inoculations intra-cérébrales, les effets du poison ne sont pas plus accusés que par les autres voies ; ils sont seulement plus prompts à se manifester, et une dose dix fois plus faible (soit 1 c c.) suffit ici pour causer une intoxication mortelle.

RAT BLANC

Bien que les auteurs qui se sont occupés de l'*Aspergillus fumigatus* ne fassent pas mention d'inoculations au rat blanc et à la souris, et que les renseignements sur leur réceptivité à l'égard des spores du champignon fassent défaut, j'ai essayé l'injection à ces deux animaux, d'un liquide de culture reconnu toxique ; les symptômes sont très analogues à ceux qui viennent d'être décrits : tremblements, crises tétaniques, manifestations paralytiques et convulsives.

Expér. XIV. — Un rat blanc reçoit, sous la peau, 12 c.c. d'un liquide de culture de 15 jours ; dose qui tue facilement le lapin de 2 kil. Au bout d'un quart d'heure l'animal est inquiet, pris d'agitations convulsives et de tremblements qui augmentent d'intensité. Puis, au bout d'une heure, on observe de la dyspnée avec fréquence extrême, de la parésie et de la paralysie ; par moments, des contractures amènent la rigidité de la queue qui se dresse verticalement. Le lendemain matin, l'animal est rétabli mais il a encore le poil hérissé, de la fréquence de la respiration et une parésie des membres assez marquée. Au bout de quelques jours, le rat est revenu à son état normal.

SOURIS

Expér. XV. — Une souris de 16 gr. reçoit, en injection sous-cutanée, 1 c.c. du même liquide de culture, soit plus de dix fois la dose mortelle pour un même poids de lapin. Au bout d'un quart d'heure les tremblements clas-

siques apparaissent, suivis d'un tétanos violent, avec crises entrecoupées de convulsions, sauts et paralysie. En outre, on observe de la raideur des pattes et de la queue, l'incurvation du corps. La souris finit par tomber sur le flanc, agitant les pattes à la façon du cobaye. Au bout de quelques heures elle a encore des tremblements, mais plus de tétanos.

On voit ainsi que la sensibilité de ces animaux au poison aspergillien est inférieure à celle du cobaye, car à la dose mortelle pour ce dernier, la toxine détermine bien des symptômes tétaniques chez le rat blanc, mais elle ne le tue pas ; et chez la souris de 16 gr. la forte dose de 1 c.c. de liquide de culture cause un tétanos et des convulsions très marquées, sans entraîner la mort.

PIGEON

Tout autres sont les résultats des inoculations au pigeon ; et ce que l'on sait de sa réceptivité à l'égard des spores de l'*Aspergillus fumigatus* est loin de les faire supposer.

Ces résultats méritent de retenir un moment l'attention, car bien qu'exceptionnels et paradoxaux, ils ne sont pas isolés en bactériologie.

Le pigeon possède une grande sensibilité aux spores de l'*Aspergillus fumigatus*. D'après Rénon, c'est « le vrai réactif expérimental de l'aspergillose ».

Il résulte d'expériences antérieures faites par Rénon qu'un pigeon de poids moyen meurt en deux à quatre jours, à la suite d'une inoculation intra-veineuse de 2 c.c. d'une émulsion de deux palettes de spores. Si la dose est moins élevée, la mort tarde davantage, mais elle arrive sûrement. Si, au contraire, la dose est plus forte, la mort survient en moins de quarante-huit heures.

J'ai tenu à répéter ces expériences fondamentales qui rendent compte de la résistance comparée, offerte aux spores de l'*Aspergillus fumigatus* par le pigeon, le lapin et le cobaye, afin de mieux montrer que leur réceptivité à l'égard de la toxine, est loin de s'exercer suivant la même loi que la réceptivité qu'ils présentent au champignon lui-même.

Expér. XVI. — Un pigeon de 306 gr. reçoit dans les veines, 2 c.c. d'eau physiologique tenant en suspension deux palettes de spores par cent. cube. Le lendemain, l'animal est en boule dans un coin de la cage ; le surlendemain, soit deux jours après l'inoculation, il meurt.

Expér. XVII. — Un lapin de 1410 gr. reçoit dans les veines, 2 c.c. de la même émulsion ; quatre jours après, il mange peu, se blottit dans un coin ; au bout du cinquième jour, il est paralysé, se tient à peine sur ses pattes et présente de la raideur du cou. Il meurt le soir du cinquième jour.

Expér. XVIII. — Quatre cobayes ont été inoculés de semblable façon : l'un meurt quatre jours après l'inoculation, un autre six jours après ; et les deux derniers au bout de huit jours.

L'on voit ainsi, combien est grande la sensibilité du pigeon aux spores d'*Aspergillus fumigatus* comparée à celle du lapin et du cobaye.

Voyons maintenant quelle est sa réceptivité à l'égard du poison (1).

Expér. XIX. — Un pigeon de 330 gr. reçoit dans le courant veineux, 5 c.c. de liquide d'une culture de 20 jours. Pendant la première heure, il a quelques battements d'ailes, un peu de tristesse, mais ne présente aucun autre symptôme. Durant un mois en observation, il n'a manifesté aucun trouble.

Expér. XX. — Un pigeon de 350 gr. reçoit de la même façon que le précédent, 10 c.c. du même liquide de culture ; il reste absolument normal.

Trois jours après, ce même pigeon reçoit 10 c.c. d'un liquide de culture de 23 jours ; il reste encore normal.

Dix jours après cette seconde inoculation, il reçoit 10 c.c. d'un liquide de 48 jours et reste normal.

Neuf jours après, on inocule de nouveau à l'animal, 10 c.c. d'un liquide de 29 jours, comme les précédents extrêmement actif ; le pigeon reste insensible et ne manifeste pas le moindre trouble morbide.

Cependant, les liquides de culture employés étaient tous capables, ainsi que je l'ai vérifié, d'amener la mort de cobayes et de lapins avec les doses et délais habituels.

Ce fait, de recevoir en l'espace de 22 jours, et à quatre reprises, une dose de 10 c.c. de liquide toxique sans en être incommodé, prouve surabondamment que le pigeon est réfractaire à la toxine de l'*Aspergillus fumigatus*. L'intérêt de ce fait est d'autant plus grand que je montrerai comment, loin de déterminer une accoutumance chez les animaux expérimentés, les injections répétées de toxine non modifiée occasionnent au contraire, une hypersensibilité au poison.

Après les belles expériences de MM. Roux et Borrel (2) et de Behring sur la persistance de la sensibilité des cellules nerveuses chez les animaux naturellement immuns contre les toxines diphtérique et tétanique, et contre des poisons comme la morphine, il était important de rechercher comment les pigeons, insensibles à l'inoculation de

(1) Au début de ces expériences, et afin d'éliminer plus sûrement les spores et les débris mycéliens qui pourraient introduire des causes d'erreur, en amenant la mort du sujet, les liquides étaient filtrés à la bougie Garros stérilisée. Ultérieurement, quand fut acquise la notion et la rapidité très grande des accidents dûs au poison, je me suis contenté de filtrer au papier, qui retient vraisemblablement moins de toxine que les bougies. L'observation de quelques animaux ayant survécu m'a d'ailleurs prouvé que cette filtration était suffisante pour prévenir le développement d'une aspergillose accidentelle.

(2) Roux et Borrel : *Tétanos cérébral et immunité contre le tétanos.* Ann. Inst. Pasteur, t. XII, n° 4. 1898.



fortes doses de toxine aspergillienne, supportent l'injection de cette toxine directement dans les centres nerveux.

Expér. XXI. — Un pigeon de 320 gr. reçoit dans le cerveau un demi cent. cube de liquide de culture de 21 jours, très toxique, comme l'a révélé l'essai sur un cobaye témoin. Or, le pigeon n'a présenté d'autres symptômes qu'une certaine anxiété, avec battements d'ailes répétés. Au bout d'une heure, l'oiseau se tient immobile dans un coin de sa cage, les yeux fréquemment fermés. Après trois ou quatre heures de cet état, il a mangé comme un pigeon sain et s'est maintenu normal.

Le pigeon, si sensible à l'aspergillose, se montre là encore, réfractaire au poison, bien que ce dernier soit employé à des doses plusieurs fois mortelles pour le lapin.

Ce fait, d'un animal extrêmement sensible à un champignon pathogène et remarquablement résistant à sa toxine, constitue une étrange exception, capable de faire germer les remarques les plus diverses. Une de celles qui s'impose tout d'abord est la suivante :

Cette résistance est-elle absolue, ou bien relative aux doses employées ?

Comme l'a montré Lucet (1), et ainsi que je l'ai constaté moi-même, un, ou même deux c.c. de liquide de culture, ne parviennent pas à provoquer chez le lapin des accidents bien manifestes ; mais, avec quelques cent. cubes de plus, on détermine chez ce même animal des accidents violents, parfois suivis de mort. N'en serait-il pas de même pour le pigeon ? Et ne peut-on penser qu'avec des doses dix, vingt ou cent fois plus fortes, l'animal ne sera pas incommodé au point de manifester des symptômes bien nets d'empoisonnement ?

Il serait téméraire de formuler des conclusions définitives à ce sujet ; et des expériences en cours, ayant pour but l'essai de doses massives au pigeon, permettront de dire ce qu'il en est. En attendant, je me garderai de conclure à l'insensibilité absolue du pigeon au poison. Tout ce qu'il est possible d'affirmer, c'est que le pigeon n'a aucun accident avec des doses 6 à 8 fois mortelles pour le lapin.

CHAT ET CHIEN

Pour être moins extraordinaire, voici une autre particularité qui mérite également de retenir l'attention. C'est que deux espèces animales considérées comme réfractaires aux spores de l'*Aspergillus fumigatus*, le chat et le chien, sont sensibles à la toxine produite par le champignon.

Expér. XXII. — Un chat de 400 gr. reçoit dans le tissu sous-cutané

(1) Lucet : *Recueil de Médecine vétérinaire*, p. 585. 1896.

20 c.c. d'un liquide d'une culture de 64 jours, liquide encore très toxique, bien que provenant d'une culture ancienne, puisque 10 c.c. tuent en une demi-journée, un cobaye de 342 gr. Le chat est pris en vingt minutes, de tremblements violents, avec opisthotonos, raideur des pattes et accès tétaniques classiques. Entre ces crises, le symptôme dominant est la paralysie des membres. Deux heures après l'inoculation, le chat reprend peu à peu son allure normale, et le lendemain, il est complètement rétabli.

La sensibilité du chat au poison, bien que très nette, est relativement faible, puisqu'il a fallu élever la dose de liquide toxique de 5 c.c. à 50 c.c. par 1000 gr. d'animal, en passant du lapin au chat, pour déterminer chez ce dernier des accidents graves.

Pour le chien, la dose mortelle et sensiblement la même que pour le lapin, malgré la résistance qu'il oppose au développement du champignon.

Expér. XXIII. — Un chien de seize kilos reçoit dans les veines 5 c.c. par kil. d'animal, du même liquide de culture inoculé au chat, soit 80 c.c. au total. La soudaineté et la violence des accidents sont frappantes. L'opération est à peine terminée, que déjà, l'animal est saisi de tremblements violents. Déposé sur le sol, il y reste couché sur le flanc et présente des accès tétaniques intenses, avec contractions toniques très marquées des membres et des muscles cervicaux. Ces crises tétaniques se succèdent ensuite très rapidement. Dans l'intervalle, les membres sont agités continuellement par des convulsions extrêmement violentes ; une demi-heure après le début du tétanos, la température rectale est déjà de 42° 3 et ces symptômes persistent sans rémission pendant plusieures heures. La mort survient après une période agonique d'environ 24 heures, dans laquelle l'animal tout à fait insensible, ne respire que faiblement, et n'offre plus qu'une sorte de trémulation des membres.

GRENOUILLE

Exp. XXVI. — Enfin, j'ai essayé des inculations à la grenouille. Rénon, et plus tard Macé, ont vu que l'introduction de conidies dans les sacs lymphatiques des grenouilles ne produit aucun retentissement marqué dans l'état des sujets.

La grenouille m'a également paru insensible à des doses considérables de poison aspergillien. C'est ainsi qu'une grenouille de 50 gr. reçoit sous la peau, 10 c.c. d'un liquide de culture très toxique pour le lapin et le cobaye ; elle ne manifeste qu'un peu de torpeur et de raideur des pattes antérieures, dues probablement à la grande extension des sacs

lymphatiques dilatés démesurément. Le lendemain, 15 c.c. du même liquide lui sont de nouveau inoculés sans qu'elle présente d'autres troubles que ceux dont je viens de parler.

De tous les animaux soumis à l'inoculation expérimentale de la toxine de l'*Aspergillus fumigatus*, le chien et le lapin sont donc incontestablement les plus sensibles. Le pigeon, par sa très grande résistance à ce poison, rend compte en grande partie, des insuccès des divers expérimentateurs, qui, assez logiquement, l'avaient choisi comme animal d'expérience dans la recherche d'une toxine produite par l'*Aspergillus fumigatus*.

§ 3. — INFLUENCE DE LA COMPOSITION DES MILIEUX DE CULTURE SUR LA PRODUCTION DE LA TOXINE.

Un fait important se dégage déjà de l'étude qui précède ; c'est que la production de toxine par l'*Asp. fumigatus* semble liée à la composition du milieu de culture. Je vais montrer en effet, que pour se former, la toxine exige la réunion, dans le milieu nutritif, d'un aliment azoté et d'un hydrate de carbone. Seule, l'une ou l'autre de ces deux substances est inapte à constituer un milieu dans lequel la toxine prendra naissance d'une façon notable.

PEPTONE

C'est en vain que j'ai recherché, du 15e au 50e jour, des propriétés toxiques au liquide des cultures faites sur milieu simplement peptonisé, ainsi qu'en témoignent les expériences suivantes :

Expér. XXV. — Une culture de 21 jours, faite sur bouillon peptonisé à 1 0/0, est filtrée, et 15 c.c. du filtrat sont inoculés à un cobaye ; l'animal ne présente aucun symptôme d'intoxication, aucun accident même léger. Quelques jours après, il reçoit de nouveau, 15 c.c. d'un liquide de 37 jours ; il reste encore normal.

L'absence de phénomènes d'intoxication n'implique pas encore ici l'absence rigoureuse de poison. Ce dernier existe peut-être dans le liquide inoculé, mais en proportions si faibles que son action passe inaperçue avec les moyens d'observation employés. Il est permis de penser qu'avec des doses massives, on eût peut-être observé des accidents sérieux très nets.

A ce bouillon peptonisé à 1 p. 100, il suffit par conséquent d'une

simple addition de glucose (puisque telle est la composition du milieu nutritif normalement employé) pour favoriser l'élaboration du principe toxique par le champignon, et la rendre manifeste dès le 12e jour de son développement à 30°.

Je me suis demandé comment se comportaient divers hydrates de carbone, tels que saccharose, dextrine, etc., substitués au glucose. Voici les résultats obtenus :

SACCHAROSE

Expér. XXVII. — L'*Aspergillus fumigatus* est ensemencé sur un milieu nutritif composé de 1 % de peptone et de 3 % de saccharose. Au bout de 15 jours de végétation, le liquide de culture est filtré, et un cobaye de poids moyen en reçoit 15 c.c. en inoculation sous-cutanée. Au bout de 10 minutes, il est pris de tremblements intenses et de convulsions tétaniques ; le lendemain, il est normal.

DEXTRINE

Expér. XXVIII. — Dans les mêmes proportions, la dextrine est substituée au saccharose ; au bout de 15 jours de végétation à 30°, la culture est sacrifiée, et le liquide filtré. Quinze c.c. de ce liquide sont inoculés à un cobaye ; ils provoquent chez ce dernier, au bout de 20 minutes, l'apparition de tremblements intenses et de phénomènes paralytiques. Au bout d'une heure, l'animal présente les symptômes tétaniques violents habituels ; le lendemain, il est revenu à la normale.

MALTOSE

Expér. XXIX. — Le maltose est ici substitué à la dextrine ; au bout du même temps de végétation. 15 c.c. du liquide de culture sont inoculés à un cobaye. Les tremblements habituels surviennent rapidement, suivis des phénomènes classiques de tétanos et de paralysie ; le lendemain, le cobaye est normal.

Les résultats sont donc sensiblement les mêmes avec l'une ou l'autre de ces substances ternaires. Au bout du même temps, il semble bien cependant que le maximum de rendement soit obtenu avec le glucose comme aliment ternaire.

LACTOSE

Le lactose ne paraît pas être consommé activement par l'*Aspergillus fumigatus* ; la culture s'y développe mal et avec lenteur ; de plus, la toxicité du liquide de culture m'est apparue entièrement nulle jusqu'au 35e jour, ainsi qu'il résulte des expériences suivantes :

Expér. XXX. — Une culture d'*Aspergillus fumigatus* faite sur un milieu lactosé peptonisé, est utilisée au bout de 15 jours ; le liquide est fort peu alcalin, et en même temps, fort peu coloré ; 15 c.c. sont inoculés à un cobaye de poids moyen ; on n'observe rien d'anormal dans la suite chez le cobaye.

Un autre cobaye, ayant reçu la même dose d'un liquide provenant d'une culture de 32 jours, n'a pas manifesté le moindre trouble.

Il est encore ici de toute prudence de ne pas conclure hâtivement à l'absence totale de poison dans les liquides de culture lactosés. Il se peut que des traces de toxine existent, imperceptibles aux doses inoculées ; mais qu'une autre méthode, plus sensible que celle qui est employée ici, saurait révéler.

MOÛT DE BIÈRE

Avec le moût de bière (1), contenant maltose et dextrine, mais peu d'azote organique, comparativement aux solutions peptonisées à 1 p. 100, la toxine n'apparait que tardivement, et en faibles proportions comme l'indiquent les expériences suivantes :

Expér. XXI. — Seize cent. cubes d'un liquide d'une culture sur moût de bière à 3 p. 100 et âgée de 17 jours sont inoculés à un cobaye. A aucun moment l'animal ne présente de symptômes anormaux.

Avec 15 c.c. d'un liquide d'une culture de 31 jours, un autre cobaye inoculé, a présenté au bout d'une heure, des tremblements d'une moyenne intensité ; au bout de trois heures, ces tremblements ont disparu, et il ne persiste plus qu'une légère hyperexcitabilité. Avec 20 c.c d'un liquide d'une culture de 21 jours inoculés à un autre cobaye, on ne peut observer durant la journée, qu'un peu de stupeur chez l'animal ; au reste, il est parfaitement tranquille et normal.

On voit qu'il est impossible de déterminer avec le moût de bière employé comme liquide de culture, des accidents appréciables chez le cobaye, même à la dose de 20 c.c. pour un animal de 436 gr. Au 30e jour seulement, et à la dose de 15 c.c. pour un cobaye de 400 gr., le filtrat de culture occasionne des tremblements et une hyperexcitabilité qui persistent deux à quatre heures, et disparaissent sans laisser de traces.

Rappelons que c'est avec ce liquide, ou tout au moins avec un moût de bière très voisin que Rénon et Lucet réalisèrent la plupart de leurs expériences.

La qualité et la quantité de l'aliment azoté jouent donc un rôle important dans la production de la toxine. C'est l'azote organique, parti-

(1) Le moût de bière employé ici, titrait 3 0/0 de maltose et 3 0/0 en plus d'hydrates de carbone exprimés en glucose.

culièrement l'azote des peptones, qui convient le mieux, et il faut que la proportion de la matière azotée soit assez élevée pour que le poison se forme abondamment.

RAULIN

Enfin, j'ai utilisé le liquide de Raulin qui constitue un milieu nutritif de choix pour les Aspergillus. Il a aussi été employé par Lucet dans la recherche de la toxine de l'*Asp. fumigatus*. Il y a donc intérêt à étudier son rôle dans la production du poison.

Expér. XXXII. — Une culture de 21 jours sur Raulin, est filtrée au papier, et 10 c.c. du liquide sont inoculés à un lapin de 1220 gr dans le tissu sous-cutané. On n'observe rien d'anormal. Deux jours après, le même lapin reçoit dans les veines, dix cent. cubes de liquide d'une culture de 23 jours sur Raulin ; l'animal reste encore normal.

Expér. XXXIII. — Un cobaye reçoit en injection sous-cutanée, 20 c.c. d'un liquide d'une culture de 31 jours, la réaction est nettement alcaline. L'animal est pris de tremblements en l'espace de 20 minutes. Au bout d'une demi-heure, il présente des convulsions et des crises tétaniques avec les symptômes violents habituels. Il revient peu à peu à son état normal.

Expér. XXXIV. — Un lapin de poids moyen reçoit dans les veines, 10 c.c. du liquide de culture employé dans l'expérience précédente. L'animal est pris en 5 minutes, de tremblements, de marche en arrière, de tétanos violent et de convulsions ; mais il se remet peu à peu.

Ce n'est donc que vers le 30e jour que l'on peut constater la présence de toxine dans le liquide de culture de Raulin ; toutefois, il semble bien qu'elle est beaucoup moins active, ou beaucoup moins abondante que sur le milieu glucosé peptonisé. Il est probable que dans ce cas, le retard dans l'apparition du poison provient de l'absence de peptone et aussi de l'acidité du milieu ; car l'addition de 1°/₀ de peptone au liquide de Raulin suffit pour que dès le *16e jour*, le filtrat devienne toxique, à ce point qu'il occasionne à la dose habituelle, les symptômes ordinaires de l'intoxication. L'expérience qui suit le démontre.

Expér. XXXV. — Une culture d'*Aspergillus fumigatus*, faite sur Raulin additionné de 1°/. de peptone, est utilisée après 16 jours d'exposition à l'étuve à 30°. On injecte à un cobaye 15 c.c. du liquide dont la réaction est légèrement alcaline. En 15 minutes, l'animal est pris violemment ; il a des tremblements, de la paralysie, et présente les accidents ordinaires.

J'ai remarqué en outre, que, sur le milieu de Raulin peptonisé ou non peptonisé, l'apparition de la toxine se fait en même temps que l'apparition de la réaction alcaline, et cela ne me semble pas une simple coïncidence, car j'ai fait cette constatation avec les autres milieux

nutritifs. Sur bouillon contenant 1 % de peptone Chassaing et 3 % de glucose, et qui se trouve ainsi normalement un peu acide, le champignon augmente légèrement l'acidité dans les premiers jours ; puis, il neutralise cette acidité, et le liquide devient alcalin ; or, c'est précisément au moment où la réaction devient franchement alcaline qu'apparaissent les propriétés toxiques.

Indépendamment de ces conditions de milieu, j'ai remarqué que la production de toxine semble plus active dans les vases à fond plat, permettant un facile accès de l'air, et dans lesquels la culture s'étend à la surface d'une couche de liquide de 2 c/m de hauteur environ.

---

§ 4. INFLUENCE DE L'AGE DES CULTURES.

Je devais aussi m'arrêter à rechercher le temps de végétation nécessaire pour que la toxine soit décelable dans les liquides de culture. Pour cela, les liquides des cultures de divers âges préparées dans des conditions identiques, ont été inoculés à doses égales. On sait déjà à quoi s'en tenir sur les cultures de 13 jours, et au delà ; voici quelques indications pour les cultures d'âge inférieur à 13 jours.

EXPÉR. XXXVI. — Un cobaye de poids moyen reçoit sous la peau, 15 c.c. d'un liquide d'une culture de *cinq jours* ; ce liquide est très acide. L'animal ne présente rien d'anormal. Un autre cobaye reçoit la même quantité d'un liquide de culture de *six jours* sans manifester le moindre trouble. Avec 15 c.c. d'un liquide de *sept jours*, un nouveau cobaye ne présente encore rien d'anormal.

Enfin, un liquide provenant d'une culture âgée de *dix jours*, inoculé à un cobaye, toujours à la dose de 15 c.c., provoque l'apparition de tremblements bien accusés avec quelques phénomènes tétaniques et paralytiques. A ce moment, le liquide de culture est alcalin.

Relativement à l'âge des cultures, ces expériences permettent d'affirmer que, sur les milieux peptonisés à 1 p. 100 et glucosés à 3 p. 100, la toxine apparaît vers le 10e jour, (la végétation s'effectuant à 30°) capable de provoquer chez le cobaye l'apparition de symptômes d'intoxication très nets. Enfin, on a vu qu'au 14e jour elle était mortelle pour le cobaye de poids moyen, à la dose de 10 c.c. ; et qu'elle tuait le lapin à la dose moyenne de 5 c.c. par 1000 gr. d'animal.

Mais, je crois devoir faire remarquer à nouveau, que l'absence de toxine dans les liquides des cultures de moins de neuf jours, n'est que relative ; et qu'il ne faut pas perdre de vue que la dose injectée, ainsi que le choix du sujet d'inoculation, sont des facteurs importants dans

la manifestation du pouvoir toxique. Une méthode d'expérience qui permettra de condenser le pouvoir toxique dans un faible volume de liquide à inoculer, sera déjà par là-même, capable de plus de précision et de sensibilité que celle dont je me suis servi.

Ayant présentes à l'esprit, toutes les causes qui influent sur l'apparition de la toxine aspergillienne dans ses liquides de culture, et étant donnée la réceptivité des divers animaux à l'égard de cette toxine, il devient aisé maintenant de s'expliquer, comment l'existence d'un poison causant des symptômes aussi nets et aussi graves, a pu échapper aux savants expérimentateurs qui ont étudié l'*Aspergillus fumigatus*.

L'anomalie présentée par le pigeon, suffit déjà en grande partie à expliquer les insuccès de Kotliar, de Rénon et de Macé. Ils avaient pensé, et cela semblait très rationnel, que l'animal qui présentait la plus grande réceptivité aux spores du champignon, devait également, être sensible à sa toxine. Cette déduction ne se trouve pas confirmée, ainsi que je l'ai montré.

Les cultures peu âgées (5 jours), que certains ont employées, les faibles doses (1/2 ou 1 c.c.) parfois inoculées, le moût de bière utilisé comme milieu nutritif, ont également contribué pour une grande part aux observations négatives, même lorsque l'animal expérimenté appartenait à une espèce sensible.

Pourtant, j'ai fait remarquer que Lucet expérimentant sur le lapin avec *deux* cent. cubes d'un liquide de culture sur Raulin, avait réussi à constater des phénomènes thermiques. Nul doute qu'avec des doses plus considérables il eût constaté, comme je l'ai fait, des troubles graves qui l'eussent renseigné sur l'existence certaine d'une toxine.

Quant à l'activité de ce poison, elle peut paraître faible, comparée à celle des toxines bactériennes, mais il faut remarquer que le poison est ici en solution très diluée, et mélangé à d'autres produits solubles étrangers, diastases, pigments, déchets organiques, etc. ; enfin, que les liquides de culture employés ne sont peut-être pas encore les meilleurs au point de vue du rendement en toxine.

Si l'on évapore un liquide de culture, mortel pour le lapin, à la dose de 5 c.c. par kil. d'animal, on obtient un résidu, dont le poids après dessication, est de 0 gr. 007 par cent. cube, et dont la toxine ne représente qu'une faible partie, impossible jusqu'ici à déterminer. Cela suffit à montrer qu'il s'agit en réalité, d'un poison plus actif qu'on ne pouvait le penser tout d'abord. D'ailleurs, des recherches sur l'isolement du poison, qui sont actuellement en cours, permettront d'abaisser la dose mortelle.

En inoculations intra-veineuses, j'ai observé que la toxine agit plus rapidement qu'en inoculations sous-cutanées ; mais j'ai remarqué aussi que la dose mortelle est en même temps abaissée, ainsi qu'il ressort des expériences suivantes :

Expér. XXXVII. — Un lapin de 1790 gr. reçoit dans les veines *quatre* c.c. d'un liquide d'une culture de 16 jours. En cinq minutes, l'animal est pris des accidents habituels, violents. Il meurt dans la nuit.

Expér. XXXII. — Un lapin de 1340 gr. reçoit *deux* c.c. *et demi* du même liquide : il est pris rapidement de tremblements avec paralysie très nette des membres ; le tétanos est peu accusé, et l'animal se remet peu à peu.

Expér. XXXIX. — Un lapin de 1250 gr. reçoit *un* c.c. du même liquide dans l'appareil circulatoire ; en cinq minutes, il est pris de tremblements et de parésie, mais ne présente pas de crises tétaniques ; l'animal se remet ensuite. Une fois rétabli, ce même lapin reçoit dans la soirée, *deux* c.c. du liquide précédent ; il est presque aussitôt pris de tremblements et de violents accès tétaniques entrecoupés de convulsions et de paralysie. L'animal meurt dans la nuit.

On constate ainsi, que par voie intra-veineuse, la dose mortelle pour le lapin est voisine de 2 c.c. par 1000 gr. d'animal. Avec *moins d'un cent. cube*, les symptômes sont encore très accusés.

---

§ 5. — ACTION DE LA CHALEUR SUR LA TOXICITÉ DES LIQUIDES DE CULTURE.

En étudiant quelques-unes des propriétés du poison produit par l'*Aspergillus fumigatus* et en particulier sa façon de se comporter vis à vis de la chaleur, des précipitants, etc., il sera possible de connaître les affinités du principe toxique.

On a déjà vu, au cours de ce chapître, que la chaleur exerce sur la toxine de l'*Aspergillus fumigatus* une action entravante ; mais pour être définitivement fixé sur la résistance du poison aux températures élevées, il est nécessaire d'avoir recours à des expériences plus concluantes. A cet effet, les liquides reconnus toxiques et destinés à recevoir l'action de la chaleur, ont été soumis, soit à des températures variées pendant des temps égaux, soit à une température constante pendant des temps de chauffe différents. Les liquides sont ensuite inoculés au lapin ou au cobaye à des doses qui les tuaient sûrement, avant que le liquide ait subi l'action de la chaleur. Les résultats obtenus sont consignés dans les expériences qui suivent :

Expér. XL. — Un liquide d'une culture de 20 jours est chauffé à *soixante degrés* au B. M. pendant trois quarts d'heure. On en injecte 10 c.c. à un cobaye; au bout de 15 minutes environ l'animal est atteint ; il présente les accidents graves habituels. Le tremblement général prédomine surtout, ainsi que la paralysie du train postérieur ; il y a quelques convulsions, mais elles semblent moins violentes qu'avec la toxine non chauffée. Le lendemain le cobaye est rétabli.

Expér. XLI. — Un cobaye reçoit 12 c.c. 5 du même liquide chauffé à *soixante-dix degrés* pendant 3/4 d'heure; les accidents classiques se manifestent encore, et avec autant d'intensité que pour le cobaye précédent. Le lendemain, l'animal est revenu à son état normal.

Expér. XLII. — Un cobaye reçoit 10 c.c. 7 du même liquide chauffé à *quatre-vingts degrés* pendant 3/4 d'heure. Il est atteint au bout de 25 minutes de la même façon, et avec autant d'énergie que les précédents.

Expér. XLIII. — Un autre cobaye reçoit 12 c.c. 5 du liquide précédent, chauffé à *quatre-vingt dix degrés*, pendant 3/4 d'heure. Durant la première heure, l'animal a le poil un peu hérissé, mais on n'observe pas de tremblements ; il reste ensuite blotti dans un coin de sa cage sans présenter aucun phénomène convulsif.

Ces expériences semblent indiquer que le poison est nettement altéré par 3/4 d'heure de chauffe à *quatre-vingt dix degrés*. Est-il complètement détruit ? On ne saurait l'affirmer, car le cobaye de l'expérience précédente (XLIII) n'est pas absolument normal à la suite de l'inoculation ; avec une dose plus élevée, il est permis de penser que d'autres accidents se seraient produits. Tout ce qu'il est possible d'affirmer ici, c'est que *dans les conditions de l'expérience* XLIII, le poison de l'*Aspergillus fumigatus* n'a plus d'action tétanisante ou paralytique sur le cobaye.

Voici maintenant des expériences qui prouvent qu'à des températures plus élevées que précédemment, le liquide perd assez peu de sa toxicité lorsque le temps de chauffe est réduit.

Expér. XLIV. — Un liquide d'une culture de 20 jours est chauffé à 100° pendant *cinq minutes*; inoculé à un cobaye à la dose de 10 c.c., il détermine chez cet animal, au bout de trente minutes, des accidents violents.

Expér. XLV. — Un cobaye reçoit 20 c.c. du même liquide chauffé à 110° pendant *dix minutes*. Dans les deux heures qui suivent l'injection, on observe un peu de tremblement, mais pas de tétanos ni de convulsions ; le lendemain l'animal est parfaitement normal.

Expér. XLVI. — Un cobaye de 380 gr. reçoit 20 c.c. du même liquide chauffé pendant *trente minutes à la température de 120°*. L'animal ne manifeste aucun tremblement, ni soubresauts, ni mâchonnements : il est aussi alerte qu'avant l'inoculation.

Ces dernières expériences établissent que le temps de chauffe est un facteur important dans l'atténuation de la toxicité des liquides de culture ; il a autant d'influence que l'échelle de la température. C'est ainsi qu'un liquide toxique chauffé trois quarts d'heure à 90° est aussi inoffensif que s'il avait été chauffé 30 minutes à 120°.

L'inoculation intra-veineuse au lapin, de toxine chauffée, permet de constater mieux encore, l'action entravante de la chaleur sur le poison, car l'animal ainsi que le mode d'inoculation choisis donnent plus de sensibilité à l'expérience.

Expér. XLVII. — Un lapin de 2 kil. 780 reçoit dans les veines 24 c.c. 5 du liquide d'une culture de 20 jours, chauffé à 100° durant 20 minutes. On n'observe chez l'animal ni tremblements ni parésie, ni contractures ou convulsions ; seulement un peu d'anxiété et d'hyperexcitabilité ; peu à peu, il redevient absolument normal ; cependant qu'un témoin inoculé avec une dose comparable de liquide non chauffé meurt dans la nuit, après avoir présenté tous les accidents habituels.

Expér. XLVIII. — Un lapin de 2714 gr. reçoit 14 c.c. du même liquide chauffé 45 minutes à 90°. On ne constate, après l'inoculation, qu'un peu d'hyperexcitabilité, de la fréquence de la respiration et de l'anxiété, mais pas de tremblements. Au bout d'une heure, l'animal est revenu à son état normal.

Expér. XLIX. — Un lapin de 2700 gr. reçoit dans les veines 14 c.c. de liquide chauffé à 85° pendant 45 minutes, et provenant d'une culture de 20 jours. Au bout de 5 minutes, on remarque un peu de tremblement et d'hyperexcitabilité musculaire ; puis, ces symptômes s'atténuent et s'effacent ; quatre heures après l'inoculation, l'animal est revenu à son état normal.

Ainsi, les températures de 100°, 90° et même 85°, quand le temps de chauffe a été suffisamment prolongé, atténuent considérablement la toxicité des liquides de culture ; cependant, il persiste encore quelques légers troubles qui sont l'indice de traces du poison non entièrement détruit.

Expér. L. — Enfin, le liquide chauffé à *cent vingts degrés* pendant 30 minutes a été inoculé à un lapin de 1950 gr. qui en a reçu la dose considérable de *quatre-vingt-dix c.c.* en une seule fois. Au début, et pendant une demi-heure, il présente un peu d'anxiété et de très légers tremblements, puis l'animal se remet, et l'on n'observe plus chez lui qu'une légère fréquence de la respiration qui ne tarde pas d'ailleurs à disparaître.

A la température de 120° et avec un temps de chauffe de 30 minutes, il semblait que le poison était détruit ; le cobaye de l'expérience XLVI n'avait présenté aucun symptôme avec 20 c.c. inoculés dans les mêmes conditions. On vient de voir que le même liquide inoculé à haute dose, produit des troubles nets et bien perceptibles chez le lapin, espèce animale plus sensible.

Il résulte donc de cet ensemble d'expériences que le poison de l'*Aspergillus fumigatus* est d'une nature telle, qu'il oppose à l'action destructive de la chaleur une résistance considérable. Cependant, il paraît à peu près complétement détruit après 30 minutes de chauffe à 120°, et l'on a vu qu'au voisinage de 85° le chauffage suffisamment prolongé altère singulièrement la substance toxique au point de la rendre aussi inerte qu'un chauffage à 120°, mais de durée moindre.

La destruction de la toxine me semble réalisée ici, bien plus par le fait d'un chauffage prolongé que par celui d'une température élevée ; elle paraît, en cela, d'un ordre tout différent de celui des toxines proprement dites.

Le tableau suivant, résume en les comparant, les résultats obtenus dans les expériences précédentes.

Numéro de l'expérience	Espèce inoculée et poids	Dose de liquide inoculée	Température du chauffage	Temps de chauffe	Symptômes observés
4	1830 gr. lapin	10cc	110°	15 minutes	un peu d'anxiété
40	280 gr. cobaye	10cc	60°	45 —	q.q. convul. et paralysie
41	347 gr. —	12cc 5	70°	45 —	id.
42	300 gr. —	10cc 7	80°	45 —	id.
43	348 gr. —	12cc 5	90°	45 —	un peu d'anxiété
44	300 gr. —	10cc	100°	5 —	accidents graves
45	300 gr. —	2cc	110°	10 —	un peu de tremblements
46	330 gr. —	20cc	120°	30 —	rien en apparence
47	2780 gr. lapin	24cc 5	100°	20 —	un peu d'hyperexcitabilité
48	2714 gr. —	14cc	85°	45 —	id.
49	2700 gr. —	14cc	90°	45 —	un peu d'excitabilité
50	1950 gr. —	90cc	120°	30 —	anxiété et très légers tremblements

Cette façon de se comporter vis-à-vis de la chaleur, éloigne sensiblement la toxine aspergillienne des toxines vraies ; et ce que l'on vient d'observer suffirait déjà, semble-t-il, à l'éloigner définitivement du groupe des toxines proprement dites, si l'on ne savait que la résistance à de hautes températures est partagée par quelques-unes de ces dernières. Cela m'a conduit à examiner si le poison aspergillien ne partage pas quelque autre propriété des toxines vraies ; par exemple

celle d'adhérer fortement aux précipités colloïdaux provoqués dans leur solution ; ce qui revient à tenter l'isolement du principe toxique, qui n'a jusqu'ici été étudié qu'en solution.

§ 6. — ESSAIS D'ISOLEMENT DU PRINCIPE TOXIQUE.

On a vu que les toxines proprement dites, sont comme les diastases, entraînées par les précipités de colloïdes que détermine l'alcool au sein des liquides qui les renferment. Elles sont entraînées de même par un précipité de phosphate calcique, et ces caractères entrent en ligne de compte dans la définition des toxines vraies. Il est naturel de chercher à voir si la toxine de l'*Aspergillus fumigatus* possède cette propriété.

J'ai d'abord essayé la précipitation par l'alcool.

EXPÉR. LI. — Une culture de 31 jours sur liquide peptonisé glucosé, exposée à l'étuve à 30°, est filtrée au papier. Cinquante cent. cubes du liquide de culture sont traités par trois fois leur volume d'alcool absolu. Il se fait alors un précipité blanchâtre peu abondant, que l'on recueille sur un filtre. On le dessèche à basse température dans le vide, et il est injecté en solution dans de l'eau, à un cobaye. Ce dernier ne se montre nullement incommodé et reste parfaitement normal.

EXPÉR. LII. — Cent cent. cub. de liquide d'une culture d'un mois et 20 jours, sont traités par 300 c c. d'alcool absolu puis filtré à la bougie Garros, de l'extérieur à l'intérieur. Le précipité retenu sur les parois de la bougie est repris par l'eau et inoculé à un cobaye ; l'animal ne présente pas le moindre trouble.

Ce procédé d'obtention du principe toxique a donc totalement échoué ; le précipité recueilli est totalement dépourvu de nocivité. Je me suis alors adressé à une autre méthode qui sert encore à la préparation des diastases et qui consiste à former un précipité de phosphate de calcium au sein du liquide de culture.

EXPÉR. LIII. - J'ai prélevé 60 c.c. de liquide d'une culture de 25 jours ; et, à l'aide de solutions titrées de phosphate de soude et de chlorure de calcium, j'ai déterminé dans le liquide la formation d'un précipité abondant de phosphate calcique. Le précipité est séparé par filtration, puis mis à macérer un quart d'heure dans 10 c.c. d'eau distillée ; on filtre à nouveau, et le filtrat est injecté dans les veines d'un lapin. Ce dernier ne présente aucun accident, même léger.

EXPÉR. LIV. — Cent trente cent. cubes du liquide de culture précédent sont soumis au même traitement. Cette fois, le précipité de phosphate de chaux obtenu est trituré avec un peu d'eau, et inoculé sous la peau d'un cobaye. Aucun accident ne se produit ; on n'observe qu'un très léger tremblement, à peine perceptible.

Expér. LV. — Le liquide dans lequel s'est effectué le précipité calcique de l'expérience précédente, est repris, filtré, et inoculé sous la peau d'un cobaye à la dose de 20 c.c. Au bout d'une demi-heure, l'animal présente les symptômes d'une intoxication violente ; les accidents apparaissent avec la même netteté, avec la même violence, que s'ils étaient produits par le liquide non préalablement soumis à la précipitation. Au bout de trois heures, l'animal est couché, complètement paralysé. *Il meurt dans la nuit.*

Expér. LVI. — Ce même liquide, encore pleinement toxique malgré une première précipitation, est repris encore une fois, et l'on y détermine un second précipité de phosphate de chaux. Le précipité inoculé au cobaye ne détermine aucun accident, même léger. Au contraire, le liquide clair surnageant, inoculé à un nouveau cobaye à la dose de 20 c.c., détermine chez cet animal des accidents tout aussi violents que la première fois, et en moins d'une demi-heure. Le cobaye succombe dans la nuit, après avoir manifesté les crises tétaniques et paralytiques bien connues.

Ces expériences me semblent des plus concluantes : toute tentative d'isolement partiel, ou de purification de la toxine à l'aide des procédés couramment employés pour les diastases, reste infructueuse. Non seulement les précipités n'ont entraîné aucun produit toxique ; mais le liquide résiduel garde toute sa toxicité première. Le poison reste en solution ; loin d'être précipité par l'alcool absolu, il y est soluble. C'est là, je pense, une indication fort précieuse pour des recherches ultérieures. Du liquide primitif, pas une parcelle de toxique ne semble avoir été distraite par les opérations de précipitation ; et, si dans l'expérience LIV, on a pu observer un léger symptôme, il est plutôt attribuable à une imbibition par le liquide toxique, du précipité non lavé.

Ces caractères négatifs sont d'un grand poids pour déterminer la nature du poison aspergillien. Il ne pourra certes pas se placer à côté des toxines diphtérique ou tétanique. L'action de la chaleur l'avait déjà fait pressentir ; les procédés d'extraction que je viens d'exposer, et qui ont échoué, achèvent de le démontrer.

Un autre fait vient s'ajouter à cette manière de voir. J'ai observé dans quelques expériences que le poison de l'*Aspergillus fumigatus* dialyse notablement. Dans l'eau distillée où baigne le dialyseur, on retrouve le principe toxique du liquide de culture, mais dilué, et par conséquent, apte seulement à reproduire des troubles légers ; en tout cas, ces troubles sont identiques à ceux que produisent l'injection de faibles doses de filtrats de culture. Or, l'on sait que les toxines proprement dites, comme les diastases, ne dialysent que très faiblement.

Faut-il maintenant ranger le poison de l'*Aspergillus fumigatus* à côté des ptomaïnes alcaloïdiques de A. Gautier ? Tout le fait supposer.

Cependant les documents me paraissent encore insuffisants pour permettre une affirmation catégorique ; des recherches d'ordre chimique me paraissent nécessaires. Elles sont entreprises, d'ailleurs. Toutefois, il est possible d'affirmer que ce poison n'est pas de nature complexe, en ce sens qu'il n'est pas doublé, comme beaucoup de produits microbiens, d'un principe toxique à allure de toxalbumine ; les essais qui précèdent l'auraient révélé, et auraient même permis d'en faire la séparation.

En résumé, si les caractères qui précèdent sont trop peu nombreux pour déterminer avec une rigueur absolue, les affinités chimiques du poison de l'*Aspergillus fumigatus*, ils indiquent suffisamment qu'on doit l'éloigner des toxines proprement dites, et le rapprocher du groupe des poisons chimiques. Un nouveau travail s'impose à la suite de celui-là, mais il appartient plutôt au chimiste de l'entreprendre ; l'œuvre du biologiste s'arrête ici.

Un autre caractère qu'il est possible de préciser bien nettement, et qui a sa place dans ce chapitre, c'est le degré de diffusibilité ou de solubilité du poison, lequel passe malaisément dans le liquide de culture, ainsi qu'il résulte de l'expérience suivante :

Expér. LVII. — Une culture de 50 jours, bien sporulée, est séparée du liquide sous-jacent, puis lavée à plusieurs reprises à l'eau distillée. Elle est dilacérée à l'aide du broyeur Borrel, et mise à macérer 24 heures dans de l'eau distillée, de façon à ce que les produits intra-cellulaires puissent passer des cellules dilacérées dans le liquide de macération. Trente cent. cubes de ce liquide sont inoculés à un lapin de poids moyen. L'animal est pris immédiatement de tremblements, puis de parésie, mais non de convulsions. Le lendemain il est revenu à la normale.

Les accidents obtenus ainsi, ne sont pas comparables en gravité à ceux que détermine le filtrat de culture lui-même. Néanmoins ils indiquent nettement que des substances nocives intra-cellulaires, très probablement de même nature que les produits extra-cellulaires, ont émigré en partie dans le liquide de macération. Normalement, ils sont peut-être loin d'y émigrer en totalité ; en tout cas, l'on ne peut songer à extraire intégralement le poison, des liquides de culture seulement.

Il reste encore un point à élucider. Ce poison est-il identique à celui que MM. Ceni et Besta ont extrait du même champignon ?

Les analogies entre les deux substances sont frappantes, notamment en ce qui concerne la résistance à la chaleur, les effets sur certains animaux, etc. Mais il existe des différences assez nettes dans la

sensibilité de quelques espèces animales. Ainsi, Ceni et Besta ont noté que le cobaye est assez réfractaire au poison qu'ils extraient du champignon par l'éther; tandis qu'en utilisant seulement le filtrat de culture, j'ai constamment observé l'incontestable sensibilité du cobaye à l'égard de ce liquide.

Quoi qu'il en soit, on peut penser que c'est aux effets de ce poison que succombent certains animaux dans le cas d'aspergillose expérimentale à évolution rapide, et dans lesquelles le mécanisme de la mort restait très obscur, malgré les hypothèses de Kotliar, Lucet et Rénon.

La découverte de la toxine aspergillienne vient donc éclairer d'un jour nouveau cette partie de l'histoire de la mycose ; mais son intérêt n'est pas limité à ce fait particulier : elle semble avoir une portée beaucoup plus grande, en établissant l'étroite analogie du mécanisme infectieux des mycoses internes, avec celui des maladies bactériennes. Enfin, le poison de l'*Aspergillus fumigatus* permet de chercher dans une voie nouvelle, l'immunisation des animaux contre la mycose aspergillaire : c'est ce que j'ai tenté dans le chapitre qui suit.

CHAPITRE III

Tentatives d'immunisation contre la mycose aspergillaire.

§ 1. GÉNÉRALITÉS SUR LES MÉTHODES D'IMMUNISATION.

Je n'ai pas l'intention d'exposer ici les théories de l'immunité ni d'en expliquer le mécanisme; on se reportera aux nombreux ouvrages (1) où la question est spécialement traitée avec tout le développement qu'elle comporte. Je me bornerai seulement à rappeler quelques généralités qui ne me paraissent pas superflues pour faciliter l'exposition de mes recherches au cours de ce chapitre.

Dans l'immunité expérimentale, on se propose de rendre réfractaire à une affection, pour une période variable ou pour le reste de la vie, un individu susceptible de gagner cette affection.

En cherchant à reproduire l'immunité dont certains êtres sont pouvus naturellement, l'homme a mis en œuvre divers procédés qui consistent à donner à un organisme la force de résister à l'infection. Parmi ces procédés, beaucoup ont été abandonnés à cause de leur peu d'efficacité. On a cherché souvent, à utiliser divers produits antiseptiques, dont la présence dans l'organisme s'opposerait au développement du germe infectieux. Ce procédé, auquel on semble n'avoir pas encore définitivement renoncé, a toujours donné de médiocres résultats, et n'a paru servir le plus souvent qu'un intérêt spéculatif.

Les méthodes qui ont provoqué les conquêtes de la science en cette matière, sont tout autres, et reposent sur un principe différent.

(1) En particulier : METCHNIKOFF : *L'immunité dans les maladies infectieuses*. Paris, Masson. 1901.
BODIN : *Les conditions de l'infection microbienne et l'immunité*. Paris, Masson 1906.

Généralement, on s'adresse soit aux microbes eux-mêmes, soit aux produits sécrétés par eux.

La première méthode de ce genre consiste dans l'inoculation d'un microbe dont la virulence est atténuée soit par la dessication, la dilution, la lumière, la chaleur, la dialyse, l'électricité, le contact d'antiseptiques, le vieillissement ; soit par le passage en série sur divers animaux, du microbe lui-même ; soit encore par le développement du germe infectieux, dans des conditions déterminées de milieu ou de température. On inocule ainsi le microbe à des degrés de virulence régulièrement croissants ; de sorte que l'animal acquiert peu à peu une résistance qui lui permet finalement de supporter des échantillons d'une virulence considérable. C'est la méthode de Pasteur.

La dernière méthode consiste à inoculer aux animaux, les liquides de culture ne contenant plus que les produits solubles sécrétés par le microbe ; or, on sait que la plupart de ces sécrétions, surtout celles qui proviennent des microbes infectieux, renferment des toxines.

La découverte des toxines bactériennes donna une nouvelle orientation aux recherches d'immunisation. On se mit en quête de résoudre le problème par l'emploi des toxines, au lieu des virus eux-mêmes. Fränkel, Behring, Kitasato travaillèrent dans cette voie. On essaya d'abord les poisons à doses ménagées et progressives, mais on se heurta à de grandes difficultés ; les essais furent longs, difficiles, et les insuccès nombreux. On imagina ensuite d'affaiblir les poisons par la chaleur ou par des substances chimiques, comme on l'avait fait pour l'agent virulent lui-même. Ces procédés, encore employés actuellement, ont permis d'arriver à des résultats pratiques remarquables.

La deuxième méthode possède sur la première un avantage considérable. Elle confère à la fois, l'immunité contre les microbes et contre leurs toxines ; tandis que la vaccination par le microbe rend l'animal réfractaire seulement au virus, et non à la toxine. L'immunité conférée aux animaux par l'une ou l'autre de ces deux méthodes, est dite *immunité active*. L'animal reçoit une maladie bénigne, passagère, qui le prépare à résister dans la suite à l'agent virulent.

Mais, la deuxième méthode a conduit à une troisième ; on a constaté que le sang des animaux ayant acquis précédemment l'immunité contre les toxines bactériennes, renferme des substances antitoxiques désignées sous le nom d'*antitoxines*. Ces substances se forment suivant le mode général des anticorps. Le sang est devenu « toxinicide » ou mieux, antitoxique.

Les antitoxines sont douées de propriétés inverses des toxines ; elles

annulent les effets de ces dernières sans se détruire elles-mêmes. Aussi, a-t-on songé à utiliser *in vivo* l'action de l'antitoxine sur la toxine, et à faire naître ainsi une certaine immunité, par un processus de neutralisation comparable à certaines opérations chimiques.

On eut ainsi l'idée de transfuser le sérum d'un animal vacciné à un animal malade, ou en voie de le devenir, pour prévenir ou guérir la maladie. Telle est l'origine de la *sérothérapie*.

Les essais de cette nature ont été extrêmement difficiles et laborieux ; il serait trop long et hors de propos de les mentionner ici. Je me contenterai de rappeler que les applications de la sérothérapie sont aujourd'hui des plus fécondes, et des plus intéressantes en médecine. La diphtérie, le tétanos, les morsures de serpent, pour ne citer que les cas les plus typiques, sont vaincus de cette façon.

---

§ 2. — RÉSULTATS D'IMMUNISATIONS OBTENUS CONTRE LES PRINCIPALES MYCOSES.

Diverses tentatives d'immunisation contre les mycoses ont été faites, et sans résultats bien fructueux pour la plupart. Les plus remarquables sont relatives à quelques mycoses dont l'importance est notoire, telles que les Mucoro-mycoses, l'Oïdiomycose et l'Aspergillose. Elles reposent sur les diverses méthodes que je viens de rappeler. Voici le résumé des plus importantes de ces recherches.

MUCORO-MYCOSES.

En 1886, Ziegenhorn (1) se servit de l'action de la chaleur sur le mycélium, puis sur les spores du *Rhizopus Cohni* pour essayer d'en atténuer la virulence ; mais il ne put atteindre le but proposé.

Costantin et Lucet (2), en 1900, tentèrent de modifier l'action pathogène du *Rhizomucor parasiticus* en inoculant à des cobayes, des spores d'une culture développée à 52° (6e génération). Les animaux périrent. L'âge des spores parut également dépourvue d'action modificative. Barthelat (3), en 1903, recherche une toxine dans les produits solubles

(1) O. Ziegenhorn. — *Versuche über Abschwächung pathogener Schimmelpilze.* Arch. f. experim. Path. u. Pharm.. t. XXI, p. 249, 1886.

(2) Costantin et Lucet : *Rhizomucor parasiticus espèce pathogène de l'homme.* Revue générale de Bot., p. 81, t. XII, 1900.

(3) Barthelat : *Les mucorinées pathogènes et les mucoro-mycoses chez l'homme et chez les animaux.* Thèse de Paris, 1903.

des cultures de *Mucor corymbifer*, et entreprend quelques expériences en vue de l'immunisation par les toxines ; mais, n'ayant pu en déceler dans les cultures, il était à prévoir que l'action immunisante serait nulle. C'est ce qu'il vérifia.

OÏDIOMYCOSE.

En 1896, Ostrowsky (3), s'étant adressé aux produits solubles sécrétés par l'*Oïdium albicans* pour tenter la vaccination des animaux contre ce champignon, ne réussit pas à faire apparaître un semblant d'immunité. Il constata au contraire que ces produits semblaient jouir de propriétés favorisantes.

En 1900, Concetti (4) parvient à atténuer la virulence de l'*Oïdium albicans*, en soumettant le champignon à une lente dessication en présence de potasse caustique. Avec de petites doses toujours croissantes, il obtient chez les animaux une certaine immunité, à condition de se servir d'inoculations intra-veineuses. Il remarque que cette action immunisante est due à la O. R. (voir page 88 et, après injections de doses très faibles et graduellement croissantes de O. R., il réussit à en faire tolérer au lapin des doses bien supérieures à la dose minima mortelle de culture virulente.

Concetti en conclut que dans la O.R., il existe sans doute une substance immunisante, qui, introduite dans l'organisme vivant, produit une antitoxine.

Avec cette substance immunisante, il a pu retarder la mort des animaux et atténuer le tableau morbide des lésions anatomo-pathologiques.

De son côté, Roger (1) a démontré que chez les animaux vaccinés contre l'oïdiomycose, le sérum jouit de propriétés analogue à celles que possède celui des animaux vaccinés contre les bactéries.

Avec ces expériences, se poursuit l'analogie déjà ébauchée histologiquement entre l'infection oïdiomycosique et l'infection bactérienne.

ASPERGILLOSE.

Dans le domaine de l'aspergillose, pour avoir été peut-être plus nombreuses, les tentatives en vue d'obtenir une immunisation n'en sont pas moins demeurées infructueuses. En dépit des méthodes employées, on ne peut signaler jusqu'à ce jour qu'un insuccès général.

(3) Ostrowsky : *Les infections bactériennes ; recherches sur l'oïdiomycose*. Thèse. Paris. 1896.
(4) Concetti : *Archive des maladies des enfants*. 1900.
(1) Roger : *Les maladies infectieuses*. Masson. Paris. 1902.

Néanmoins, comme je me suis proposé de revenir moi-même sur ce terrain avec une arme nouvelle, je signalerai à grands traits, les essais antérieurs aux miens, et qui gardent malgré tout, une réelle valeur.

En 1894, Kotliar (1) recherche si l'*Aspergillus fumigatus* forme des substances vaccinantes. Il inocule trois pigeons dans les veines avec 2 c.c. 5 de culture stérilisée par ses méthodes (page 85) et 12 jours après, il leur inocule 1 c.c. 5 de culture virulente. Les trois pigeons meurent le 5e jour, en même temps que des pigeons témoins. « Si l'on songe, termine Kotliar, que ce champigon ne forme pas de toxines, on peut en déduire qu'il ne fabrique pas non plus de substances vaccinantes. »

Rénon (2), en 1895, reprend ces essais d'immunisation contre l'aspergillose, et se met en devoir d'utiliser pour cela toutes les méthodes connues. Je résumerai ici les plus importantes ; aucune, d'ailleurs, ne lui a donné de résultats positifs.

1° **Essais d'immunisation par le virus.** — A. *A l'aide de spores modifiées.* — Des spores ayant pris naissance sur des milieux renfermant du nitrate d'argent, de l'iodure de potassium et de l'iode ; ainsi que d'autres ayant subi l'action de la chaleur dans des tubes fermés à la lampe, avaient toutes gardé leur virulence. Cependant, celles qui dans la dernière opération, avaient perdu leur faculté germinative, furent inoculées à des lapins. Les lapins résistèrent ; mais dans la suite, ayant reçu une inoculation de spores virulentes ; tous succombèrent.

B. *A l'aide d'injections progressivement croissantes de spores virulentes.*— Là seulement, Rénon a obtenu l'ébauche de quelques résultats heureux. Et, bien qu'il déclare lui-même n'avoir abouti qu'à un insuccès général, il émet l'idée, que pour rendre les animaux réfractaires à la mycose aspergillaire, les recherches doivent être poursuivies avec cette méthode.

2° **Essais d'immunisation par les toxines.** — Malgré l'absence de toxicité de ses extraits de culture d'*Aspergillus fumigatus*, Rénon rechercha néanmoins s'ils étaient capables d'action vaccinante. Il inocula une émulsion de quelques palettes de spores, à des pigeons qui avaient résisté à l'injection des produits solubles des cultures. Les pigeons succombèrent tous.

(1) Kotliar : Ann. de l'Inst. Pasteur., t. VIII, p. 479. 1894.

(2) Rénon. — *Essais d'immunisation contre la tuberculose aspergillaire.* — C. R. Sté Biologie, p. 202, 20 juillet 1895.

3° Essais d'immunisation par les sérums. — Des lapins, ayant reçu en injection, du sérum d'un autre lapin qui avait succombé à une aspergillose expérimentale, reçurent 19 jours après, trois palettes de spores virulentes dans les veines. Ils succombèrent en 11 à 12 jours.

En 1896, Lucet (1), s'inspirant des indications de Rénon sur l'efficacité possible de la méthode des doses progressives de spores virulentes, entreprend avec elle quelques expériences, mais sans résultats heureux. Il se borne à constater comme Ribbert et Rénon, « qu'en inoculant lentement et progressivement des doses croissantes de spores virulentes, on arrive à donner aux animaux une légère survie, quand plus tard on les inocule avec des doses massives ».

---

§ 3. NOUVEAUX ESSAIS D'IMMUNISATION CONTRE L'ASPERGILLOSE.

Malgré ces tentatives infructueuses, pourtant remarquablement conduites, j'ai tenu à reprendre la question de l'immunisation contre l'aspergillose, puisqu'un fait nouveau venait de m'apparaître comme agent d'instrumentation : la présence d'une substance toxique dans les cultures d'*Aspergillus fumigatus*. Il fallait voir en effet, si ce poison était capable de vacciner contre lui-même, et contre le champignon qui l'a produit.

1° Essais d'immunisation à l'aide de doses croissantes de toxine non modifiée. — Il est certain, et cela ne doit pas surprendre avec nos connaissances actuelles sur les toxines bactériennes, que l'injection répétée de faibles doses de toxine non modifiée ne conduit pas à la vaccination. Behring et Kitasato n'ont pas réussi à conférer l'immunité contre le tétanos par l'injection de petites doses répétées de toxine tétanique non atténuée. Les animaux meurent pendant l'immunisation. Il en est de même pour la toxine diphtérique ; on arrive difficilement par cette méthode à produire l'accoutumance, il se produit une accumulation des doses, et l'animal meurt.

J'ai fait de semblables constatations avec le poison aspergillien, ainsi que le prouvent les expériences suivantes :

(1) LUCET : *Etude expérimentale et clinique sur l'Aspergillus fumigatus.* Bull. Soc. centr. méd. vétér. p. 585, 1896.

Expér. LVIII. — Un lapin de 1 kilog. 967, reçoit par voie sous-cutanée 10 c.c. d'un liquide d'une culture de 22 jours. Après avoir présenté quelques phénomènes convulsifs et paralytiques, il se rétablit. Cinq jours après cette première inoculation, il reçoit 10 c.c. d'un liquide de 22 jours ; au bout d'une demi-heure, il est atteint de tremblements, puis de sauts brusques et de convulsions violentes Il meurt dans la nuit.

Il y a donc eu ici, accumulation des doses, hypersensibilité au poison.

Expér. LIX. — Un lapin de 1440 gr. reçoit, en inoculation sous-cutanée, 3 cent. cubes de liquide d'une culture d'un mois. Il ne présente rien d'anormal.

Sept jours après, il reçoit 5 c.c. d'un liquide de culture de 23 jours ; une demi-heure après, il présente des symptômes violents : tétanos, convulsions, etc. L'animal meurt dans la nuit. La dose reçue n'était cependant pas mortelle normalement.

Expér. LX. — Un lapin de 3 kilog. 772 reçoit, dans le tissu sous-cutané, deux c.c. de liquide de culture de 21 jours, soit environ 1/10e de la dose mortelle ; il ne présente alors rien d'anormal.

Dix jours après, il reçoit *cinq* c.c. d'un liquide de 20 jours ; pendant les deux heures qui ont suivi l'injection, l'animal n'a eu qu'un léger tremblement sans convulsions, et au bout de deux heures, il paraît revenir à son état normal.

Sept jours après, le même lapin reçoit *six* c.c. d'un liquide de 24 jours. Dans la journée qui suit l'inoculation et durant les suivantes, l'animal reste normal.

Cinq jours après, il reçoit *sept* c.c. d'un liquide d'un mois ; il ne manifeste aucun symptôme.

Sept jours après, il reçoit *neuf* c.c. d'un liquide de 10 jours ; au bout de 3/4 d'heure, il présente des tremblements assez forts, respiration rapide, parésie, mais pas de convulsions ni de paralysie complète. Cet état persiste pendant 2 h. 1/2 ; puis l'animal se rétablit.

Six jours après, il reçoit *neuf* c.c. d'un liquide de 48 jours. Cette fois, l'animal ne présente pas de tremblements bien accusés, et pas de parésie. Le liquide a cependant été reconnu toxique.

Quatre jours après, le lapin reçoit 9 c.c. d'un liquide de 25 jours. Au bout d'une demi-heure, on observe de la fréquence de la respiration, un peu de tremblements, quelques cris, la marche difficile ; mais pas de convulsions ni de paralysie. A 5 heures du soir, le lapin est revenu à la normale.

Cinq jours après, l'animal reçoit *neuf* c.c. d'un liquide de 29 jours. Au bout de 3/4 d'heure, les accidents classiques se produisent, et quelques crises violentes apparaissent. L'animal se remet.

Six jours après, une dernière inoculation a lieu. Cette fois, le lapin reçoit dans les veines quelques palettes de spores. Il *meurt* au bout du 6e jour, et présente à l'autopsie les lésions rénales et hépatiques ordinaires.

L'inoculation de doses croissantes de toxine non modifiée, ne vaccine donc pas le lapin, car à la *dixième* injection qui correspond néanmoins

à la moitié de la dose mortelle, il manifeste encore des symptômes d'intoxication.

Au cours de ces expériences, j'ai constaté nettement qu'une première injection d'une dose faible de toxine, ne causant que des troubles légers et fugaces, détermine souvent une hypersensibilité très remarquable. Non seulement l'animal ne devient pas plus résistant, mais il présente au contraire une plus grande réceptivité à l'égard du poison. C'est ainsi qu'un lapin de 1.800 gr. ayant reçu 8 c.c. de toxine, sans manifester autre chose qu'un léger tremblement, est devenu sensible à ce point que trois jours après, la dose mortelle de toxine s'abaisse chez lui de 5 c.c. par kil. à 1 c.c. 6.

De tels faits, n'ont-ils pas d'ailleurs, leurs analogues dans la vaccination par certaines toxines bactériennes ?

Behring (1), à la suite de faits nombreux et probants, affirme la théorie de l'hypersensibilité acquise pendant l'immunisation.

Knorr (2) a augmenté la sensibilité des cobayes pour la toxine tétanique en leur injectant chaque jour 1/10e de la dose minima mortelle.

Behring et Kitashima (3), en faisant des injections fréquentes de très petites doses de toxine diphtérique, sont arrivés à tuer les cobayes avec 1/400e de la dose mortelle, répartie en plusieurs fois.

Ces faits sont assez significatifs, et montrent bien la grande difficulté qu'on éprouve à se servir des toxines modifiées pour tenter des vaccinations.

2° **Essais d'immunisation à l'aide de toxine modifiée.** — A. *Par la chaleur.* — Fränkel (4), le premier a utilisé ce procédé pour vacciner contre la diphtérie ; Vaillard (5) l'a employé ensuite pour vacciner contre le tétanos. Il consiste à inoculer aux animaux, des liquides filtrés, chauffés à des températures progressivement décroissantes.

Expér. LXI. — Un lapin de 1440 gr. reçoit, dans le tissu sous-cutané, 5 c.c. d'un liquide de culture de 30 jours, chauffé trois quarts d'heure à 90° : Il ne présente rien d'anormal.

Sept jours après, le même lapin reçoit 7 c.c. d'un liquide de culture de 23 jours chauffé trois quarts d'heure à *quatre-vingt dix* degrés. Rien d'anormal.

Six jours après, l'animal reçoit 10 c.c. d'un liquide de culture de 40 jours chauffé trois quarts d'heure à *quatre-vingt sept* degrés. Il ne présente aucun trouble.

(1) Behring : Allgemeine Therapie der Infections Krankeiten. p. 1052.
(2) Knorr : Experimentelle Untersuchungen über die Grenzen. etc. p. 18, 19.
(3) Behring et Kitashima : Berliner klin. Wochenschft, 1901, p. 157.
(4) Fränkel : Berliner klinische Wochenschrift, n° 48. 1890.
(5) Vaillard : Ann. Inst. Pasteur. t. vi, p. 225. 1892.

Sept jours après, il reçoit encore 10 c.c. d'un liquide de 48 jours, chauffé trois quarts d'heure à *quatre-vingt cinq* degrés : rien d'anormal.

Quatre jours après, il reçoit 10 c.c. de liquide de culture de 25 jours chauffé trois quarts d'heure à *quatre-vingts* degrés : encore rien d'anormal.

Cinq jours après, il reçoit 10 c.c. de culture de 29 jours, chauffé trois quarts d'heure à *soixante-dix sept* degrés. Au bout d'une heure, l'animal est pris d'accidents très nets : agitation, dypsnée, parésie, mais pas de convulsions ; le lendemain, l'animal est complétement rétabli.

Dix jours après, le lapin ainsi traité, reçoit en injection intra-veineuse deux cent. cubes de 3 palettes de spores. Il meurt au 5e jour. A l'autopsie, les reins et le foie volumineux sont parsemés de petits tubercules blancs en semis.

Dès la 5e inoculation, les accidents qui se sont manifestés faisaient prévoir déjà l'absence d'immunisation.

B. *Par le liquide de Gram.* — Après ce nouvel échec, je me suis adressé au liquide de Gram (solution iodo-iodurée) pour atténuer la toxicité des liquides de culture employés.

MM. Behring et Kitasato (1) ont les premiers, utilisé la modification des toxines par les agents chimiques. Ils employaient le trichlorure d'iode pour vacciner les animaux contre les toxines du tétanos et de la diphtérie. Plus tard, MM. Roux et Vaillard (2) se sont servis du mélange de toxine et d'une solution iodo-iodurée ; c'est cette dernière méthode que j'ai employée.

Expér. LXII. — Un lapin de 2387 gr. reçoit sous la peau 4 c.c. de liquide de Gram. Il ne présente dans la suite aucun symptôme.

Dix jours après, il reçoit 8 c.c. de liquide d'une culture de 20 jours, additionnés de 4 c.c. de Gram ; une demi-heure après, il présente les symptômes habituels, tremblements et convulsions, aussi violemment que s'il avait reçu une dose mortelle sans addition de Gram. L'animal meurt dans la nuit.

Expér. LXIII. — Un liquide de culture de 20 jours, très toxique, est mélangé avec un égal volume de liquide de Gram ; huit cent. cubes du mélange, renfermant par conséquent 4 c.c. de liquide actif, sont inoculés sous la peau d'un lapin de 2520 gr. Trois cobayes reçoivent aussi de la même façon 5 c.c. du liquide toxique, mélangés à 5 c.c. de Gram. Les animaux ne présentent aucun symptôme.

Huit jours après, on injecte au lapin et aux cobayes précédents 5 c.c. de liquide d'une culture de 20 jours, mélangés à 5 c.c. de Gram. Les animaux sont atteints de tremblements significatifs ; l'un des cobayes est affecté assez gravement.

Ainsi, par cette méthode, lapins et cobaye ne se montrent pas vaccinés contre la toxine ; ils ne le seront naturellement pas davantage

(1) Behring et Kitasato : Deutsche medicin Wochenschrift p.p. 1145, 1246, 1890.
(2) Roux et Vaillard : Ann. de l'Inst. Pasteur. t. VII, p. 64, 1893.

contre les spores ; c'est ce qu'il m'a été facile de constater, car les animaux ayant reçu en dernier lieu quelques palettes de spores, ne tardèrent pas à succomber dans le délai normal.

3° **Essais d'immunisation par le sérum.** — L'immunité que l'on se proposait de donner à l'aide de la toxine, est en somme nulle à considérer. Il s'en suit naturellement que le sérum des animaux inoculés avec le liquide toxique, modifié ou non, ne doit posséder aucune propriété immunisante. C'est ce qu'il était convenable de vérifier cependant.

Le lapin de l'expérience LIX, qui avait reçu de nombreuses doses successives et croissantes de liquide toxique non modifié, était tout désigné pour fournir le sérum supposé antitoxique. Le prélèvement était fait aseptiquement, et directement dans le cœur de l'animal, sans avoir besoin ainsi de le sacrifier.

Expér. LXIV. — Un lapin de 1190 gr. reçoit alors dans les veines 3 c.c. par kil. d'animal d'un liquide d'une culture de 18 jours, mélangé préalablement à 3 c.c. de sérum. Cinq minutes après l'inoculation, le lapin est pris de tremblements violents et de phénomènes paralytiques intenses. Il reste finalement aplati sur lui-même, mais sans tétanos.

Un lapin témoin a reçu, en même temps que le précédent, et dans les veines, 3 c.c. par kil. d'animal du même liquide de culture, mélangé préalablement à 3 c.c. d'eau physiologique. Il présente exactement les mêmes symptômes que le précédent.

Ces expériences indiquent avec la plus grande netteté, que les injections répétées, et à doses graduellement croissantes, de la toxine non modifiée, sont impuissantes à développer des antitoxines dans les humeurs du lapin. Il en aurait été assurément de même pour le sérum d'un lapin inoculé avec la toxine modifiée.

J'ai enfin recherché dans une dernière expérience, si les injections répétées de toxine chez le pigeon, dont on a vu la résistance étonnante au poison, ne sont pas susceptibles de lui conférer une certaine immunité contre l'inoculation des spores de l'*Aspergillus fumigatus*. Un seul essai a été fait.

Expér. LXV. — Un pigeon ayant reçu 50 c.c. de toxine très active, en cinq injections pratiquées de 8 jours en 8 jours, a été ensuite inoculé dans les veines avec de l'eau physiologique renfermant en suspension quelques palettes de spores ; l'animal a succombé à l'aspergillose dans les délais habituels.

Ainsi que mes devanciers, j'ai donc totalement échoué dans mes tentatives d'immunisation contre l'aspergillose à l'aide de la toxine nouvellement décelée dans les cultures de l'*Aspergillus fumigatus*.

Ce fait vient encore plaider contre la nature toxinique du poison de ce champignon, car il est acquis qu'on ne vaccine bien qu'avec des substances complexes, comme les toxines bactériennes.

Comme le poison aspergillien s'éloigne sensiblement par ses propriétés, des toxines qui en matière de vaccination donnent des résultats heureux et une immunité solide, il est permis de penser que les méthodes d'immunisation à employer ici, devront être différentes pour aboutir avec chances à la vaccination.

CHAPITRE IV

Recherche d'une toxine chez quelques autres champignons pathogènes.

Après la constatation de l'existence d'un poison produit par l'*Aspergillus fumigatus* dans ses cultures, il convenait de soumettre aux mêmes investigations, un certain nombre de champignons voisins qui se distinguent comme lui par une action pathogène des plus marquées. De ce nombre sont : l'*Aspergillus orizæ*, l'*Aspergillus sulphureus*, le *Rhizomucor parasiticus*, le *Rhizopus equinus*, champignons que M. le Dr Bodin a bien voulu mettre constamment à ma disposition.

Le degré de virulence de ces espèces parasites se rapproche beaucoup de celui de l'*Aspergillus fumigatus* ; les inoculations de spores au lapin et au cobaye, amènent invariablement la mort de l'animal dans d'assez brefs délais. Le tableau de l'action morbide est sensiblement le même que pour l'*Aspergillus fumigatus*.

Dans un récent travail, MM. Bodin et Savouré (1) ont étudié l'évolution de la mycose expérimentale relative à quelques-unes de ces espèces. D'après ces auteurs, les troubles et les accidents qui surviennent seraient les suivants :

Aspergillus oryzæ. — L'injection à un lapin, dans les veines, de 2 c.c. d'émulsion de spores, occasionne les désordres suivants : l'animal ne mange plus dès le quatrième jour et présente quelques phénomènes convulsifs : il meurt dans la soirée. L'autopsie révèle un foie volumineux avec lésions tuberculiformes. Les reins sont couverts d'un semis de points jaunes, très serrés, qui pénètrent dans la substance corticale sous forme de fines traînées blanc-jaunâtres.

Aspergillus sulphureus. — Deux c.c. d'émulsion de spores sont injectés dans la veine de l'oreille d'un lapin. Dès le lendemain, l'animal ne mange pas ; le quatrième jour au matin, il est pris de phénomènes convulsifs violents, portant sur les membres et sur le globe oculaire, et se poursuivant par des crises qui se renouvellent à quelques minutes d'intervalle.

(1) Bodin et Savouré : *Recherches expérimentales sur les mycoses internes*. Arch. de parasit. t. VII, p. 110, 1904.

En dehors des crises, il persiste de la contracture musculaire avec opisthotonos. Dans l'après-midi, les convulsions augmentent de violence, l'animal a des soubresauts qui le retournent complètement ; les crises deviennent de plus en plus nombreuses et de plus en plus rapprochées, jusqu'à quatre heures de l'après-midi, instant où l'animal est sacrifié. L'autopsie montre que le foie est un peu gros, parsemé de points tuberculiformes.

Rhizomucor parasiticus. — Un lapin reçoit dans une veine de l'oreille, 1 c.c. d'une émulsion de spores de ce champignon ; le quatrième jour, l'animal ne mange pas ; le cinquième jour, il est à l'agonie et reste couché sur le côté ; les pattes sont agitées de mouvements convulsifs ; surviennent enfin des convulsions, puis la mort. A l'autopsie, on remarque un foie volumineux congestionné, avec semis de petits nodules jaunâtres en quelques points. Les reins sont également couverts de tubercules miliaires. Un cobaye inoculé de la même façon, meurt le sixième jour après l'opération. A l'autopsie, mêmes constatations que pour le lapin.

Rhizopus equinus. — Un lapin est inoculé dans une veine, avec 3 c.c. d'une émulsion de spores. Au bout du quatrième jour, l'animal est pris de convulsions, suivies de contractures ; il meurt dans l'après-midi. A l'autopsie, le foie est gros, congestionné ; la rate et les reins sont recouverts de tubercules blancs qui pénètrent en traînées dans la substance corticale du rein. Un cobaye, ayant reçu une injection analogue de spores dans la cavité péritonéale, présente six jours après, de violentes convulsions, et succombe dans l'après-midi. L'autopsie révèle un foie et des reins volumineux, avec les petits tubercules blanchâtres classiques.

La mort de tous ces animaux, à la suite d'inoculations expérimentales, ressemble assez comme symptômes et comme lésions, à celles que l'on observe avec l'*Aspergillus fumigatus* ; les accidents surviennent dans un délai sensiblement voisin, ainsi que la mort.

Je me suis demandé si cette frappante analogie, ne se poursuivait pas jusque dans les résultats d'inoculation des filtrats de cultures.

Mais, je dois dire dès maintenant, que *seul*, parmi tous les Aspergillus, et parmi les autres espèces que j'ai examinées à ce point de vue, l'*Aspergillus fumigatus* s'est montré producteur d'un principe toxique dans ses milieux de culture.

Les expériences qui m'ont permis de faire cette constatation sont les suivantes :

Aspergillus orizœ. — Un lapin de taille moyenne reçoit 10 c.c. d'un filtrat d'une culture de 16 jours, en inoculation intra-veineuse. Mis en constante observation, l'animal n'a jamais rien présenté d'anormal.

Aspergillus sulphureus. — Mêmes opérations en tous points, et même résultat.

Rhizomucor parasiticus. — Un lapin de 1500 gr. reçoit dans la veine marginale postérieure de l'oreille, 20 c.c. de liquide d'une culture de 40 jours

développée à l'étuve à 30°, et filtrée à la bougie Garros : L'animal ne présente absolument aucun symptôme.

Un autre lapin pesant 1937 gr. reçoit sous la peau, 10 c.c. de liquide d'une culture de 13 jours sans manifester aucun trouble ; six jours après, il reçoit 20 c.c. de filtrat de culture d'un mois. Il reste normal. Enfin, douze jours après cette seconde inoculation, il reçoit 20 c.c. de liquide d'une culture d'un mois. L'animal reste encore normal.

Pensant que le principe toxique pouvait être intimement fixé au protoplasma cellulaire, j'ai dilacéré au broyeur Borrel une culture de *Rhizomucor parasiticus*, d'un mois et demi. Le produit du broyage est mis à macérer dans de l'eau distillée, puis filtré 12 heures après à la bougie Garros. Six cent. cubes du filtrat sont injectés dans les veines d'un lapin moyen, sans résultat.

Rhizopus equinus. — Un lapin de 1830 gr. reçoit dans la veine de l'oreille, 20 c.c. d'un liquide de culture de 40 jours. Le plus léger symptôme ne peut être observé.

Ces divers essais ont été multipliés avec des cultures de divers âges ; ils ont toujours donné des résultats négatifs en ce qui concerne l'existence d'un principe soluble toxique.

Comme on le voit, ces dernières inoculations sont bien loin de rappeler les phénomènes de convulsions violentes et de paralysie qui se produisaient chez le lapin avec la minime dose de 2 c.c. de filtrat de culture d'*Aspergillus fumigatus*.

Je ne chercherai pas à expliquer cette étrange anomalie, et je me bornerai à indiquer qu'il suffit peut-être, pour déceler d'autres poisons mycosiques, d'adopter des méthodes nouvelles d'expérience, ou de faire varier toutes les conditions de ces expériences, milieu, température, voie d'inoculation etc.

Là encore, un vaste champ reste ouvert à l'hypothèse en même temps qu'à l'expérience.

Mais, pour être quelque peu déconcertants, ces faits n'en restent pas moins fructueux. Ils offrent l'avantage de pouvoir mieux définir l'espèce pathogène *Aspergillus fumigatus* ; car, en dehors des considérations générales d'ordre biologique et médical, la production d'un poison par l'*Aspergillus fumigatus* dans des *conditions bien déterminées*, à l'exclusion d'un certain nombre d'Aspergillus pathogènes voisins, pourra intervenir utilement dans des déterminations délicates et laborieuses.

En effet, ne sait-on pas combien la détermination rigoureuse des espèces aspergilliennes est parfois longue et difficile ? Les caractères morphologiques (diamètres de spores, longueurs de stérigmates, etc.),

sont d'une telle variabilité, qu'il ne faut pas moins que toute la science et la patiente sagacité d'un spécialiste pour trancher la difficulté.

Les autres caractères auxquels on a quelquefois recours, n'ont pas davantage la fixité et la constance désirables. La couleur des spores, par exemple, est un facteur des plus variables avec la température, le milieu, etc. Le pouvoir pathogène du parasite lui-même ne peut être non plus avantageusement invoqué ; car il est des *Penicillium,* des *Sterigmatocystis* qui, comme nombre d'*Aspergillus*, deviennent pathogènes spontanément ; ils peuvent causer, sinon la mort, du moins des accidents appréciables.

La faculté, pour l'*Aspergillus fumigatus*, de produire une substance toxique dans des conditions données, constitue donc un caractère important, susceptible de rendre les plus grands services pour la détermination de cette espèce. Sans doute, la question n'est pas complètement élucidée de savoir si cet Aspergillus est, parmi les espèces pathogènes, seul capable de secréter un poison dans la plupart de ses liquides de culture ; mais il est certain déjà que plusieurs *Aspergillus* très pathogènes sont incapables de le faire dans *des conditions identiques*. Le même fait reste à vérifier pour quelques autres espèces.

Il résulterait de travaux récents de M. Paladino-Blandini (1) que le *distillat* du liquide de culture de l'*Aspergillus fumigatus* et de *certains champignons*, est susceptible de déterminer des accidents lorsqu'on l'injecte à quelques animaux comme le cobaye. Mais, comme il se forme dans la vie des champignons de nombreux composés *volatils*, provenant de la transformation des aliments de ces plantes, et que certains de ces composés peuvent être toxiques pour diverses espèces animales, cette question demande à être reprise avant que l'on en déduise des faits définitifs. Cependant, un point est actuellement bien net à cet égard ; les expériences que j'ai faites avec MM. Bodin et Lenormand, établissent que les accidents provoqués chez le cobaye par l'injection du *distillat* des liquides de culture de l'*Aspergillus fumigatus* ne sont pas dûs au poison découvert récemment dans ce cryptogame. Les affirmations de M. Paladino-Blandini, qui tendraient à prouver que ce poison est volatil, ont sans doute trait à une substance volatile élaborée par le champignon dans la culture, substance qui se retrouve dans les cultures de champignons voisins, sinon dans toutes.

(1) Paladino-Blandini : *Tossici di ifomiceti.* — Archvio di Farmacologia sperimentale e scienze affini. Anno. V. Vol. V. 1906.

CHAPITRE V

RÉSUMÉ & CONCLUSIONS

§ 1 — RÉSUMÉ ET CONCLUSIONS DE LA PREMIÈRE PARTIE.

Dans la première partie de ce travail, j'ai étudié au point de vue de quelques-unes de leurs sécrétions diastasiques, un certain nombre de champignons parasites et plus particulièrement les espèces suivantes :

Aspergillus fumigatus, Rhizopus equinus, Rhizomucor parasiticus, Trichophyton gypseum, Achorion Shœnleini, Microsporum canis.

Cette étude résulte d'observations faites tant avec les cultures elles-mêmes qu'avec l'aide des filtrats de ces cultures.

1° Ces espèces font subir au lait sur lequel elles végètent, des modifications physiques et chimiques qui intéressent plus particulièrement la matière albuminoïde caséine.

Cette caséine existe dans le lait sous trois modifications : solide, colloïdale et dissoute, formant ainsi un système en équilibre stable que peuvent modifier certains facteurs ; en particulier, les diastases présure et caséase.

Les champignons que je viens de citer, ensemencés sur le lait, en coagulent d'abord la caséine, grâce à de la présure qui agit au profit de la forme solide ; puis dissolvent le coagulum formé, grâce à de la caséine qui agit au profit de la forme dissoute. Ce sont là de simples modifications physiques.

La caséine devenue soluble, est représentée par une série de termes échelonnés (caséoses), dont le dernier constitue la caséone ; stade au-

quel la caséine présente les réactions des peptones. Ses propriétés ont alors été notablement modifiées, et très vraisemblablement à la suite d'une hydrolysation qui a dû intervenir à un moment donné. La dislocation se continue pour aboutir aux termes résiduels plus simples : urée, acides amidés, produits ammoniacaux volatils ou non, etc.

Je me suis alors demandé : 1° Si cette profonde dégradation de la caséine est l'œuvre de la caséase elle-même, ou bien celle d'une diastase trypsique qui lui serait associée. 2° Si la caséase est agent de décoagulation et de peptonisation à la fois, ou si elle est au contraire susceptible d'être dédoublée en une diastase simplement liquéfiante et une diastase peptonisante.

Chercher à résoudre ces propositions conduisait nécessairement à reprendre le problème de l'individualité ou de l'identité des diastases protéolytiques, caséase, trypsine et gélatinase.

A cet effet, j'ai examiné comment les champignons précités se comportaient vis-à-vis des principaux aliments albuminoïdes abandonnés à leur nutrition ; puis, j'ai recherché et distingué les différents pouvoirs protéolytiques de leurs filtrats de culture.

2° Les espèces cryptogamiques désignées ci-dessus, sont ensemencées sur bouillon légèrement peptonisé en présence de flocons de fibrine, ou d'albumine coagulée sous forme de tubes de Mette. Elles ne tardent pas à donner au milieu nutritif, lorsqu'il est neutre ou acide, l'alcalinité nécessaire à leur processus digestif. Dans ces conditions, certaines espèces opèrent une digestion appréciable de l'albumine ou de la fibrine, digestion qui ne peut être attribuable qu'à un ferment trypsique. Cependant, deux espèces se montrent dans ces conditions à peu près dépourvues de pouvoir albuminolytique ; ce sont : le *Rhizomucor parasiticus* et le *Rhizopus equinus*. L'absence de ce pouvoir ne semble pas constante chez le *Rhizopus equinus*, car, il apparaît si l'on substitue la glycérine au glucose dans le substratum nutritif.

3° Les six espèces cryptogamiques ensemencées sur une solution de gélatine à 12 °/₀ neutre, en amènent plus ou moins rapidement la liquéfaction. Envisagées à ce point de vue, elles forment deux groupes bien nets par la façon et la rapidité avec laquelle elles liquéfient la gélatine.

A) Un groupe à mycélium compact blanchâtre, avec lequel la liquéfaction est rapide et intense. (*Trichophyton gypseum, Achorion Schœnleini, Microsporum canis*).

B) Un groupe à mycélium lâche, gazonnant et de couleur foncée, avec

lequel la liquéfaction s'opère lentement et dificilement. *(Aspergillus fumigatus, Rhizopus equinus, Rhizomucor parasiticus)*

4° Les champignons ont été cultivés sur un milieu apte à leur assurer un optimum de développement (3 p. 100 de glucose avec 1 p. 100 de peptone). Puis, les liquides de culture sont filtrés et examinés en vue de leurs pouvoirs protéolytiques. A ce moment, je me suis préoccupé d'appliquer une technique rigoureuse pour éviter l'intervention des microbes de l'air. Les opérations de filtration et de répartition des liquides sont faites aseptiquement à l'aide d'un appareil construit à cet effet.

Les résultats sont identiques à ceux qui ont été obtenus lorsque les champignons étaient directement en rapport avec la substance à transformer. Ils permettent de dresser le tableau suivant où les sécrétions protéolytiques sont indiquées pour chaque champignon :

	Présure	Caséase	Trypsine	Gélatinase
Aspergillus fumigatus.........	+	+	+	+
Rhizopus equinus.............	+	+	t. faible	tr. faible
Rhizomucor parasiticus	+	+	—	tr. faible
Trichophyton gypseum........	+	+	+	+
Achorion Schœnleini..........	+	+	+	+
Microsporum canis............	+	+	+	tr. active

Ces résultats ne renseignent pas il est vrai, sur la quantité ou l'activité respectives des diastases produites ; mais, ils permettent certaines déductions comparatives, et donnent lieu à la constatation de quelques faits saillants ; ce qu'il importe surtout de connaître.

Ainsi : le *Rhizopus equinus* est un faible producteur de trypsine et de gélatinase ; le *Rhizomucor parasiticus* ne produit pour ainsi dire pas de trypsine et produit de la gélatinase en très faibles proportions ; le *Miscrosporum canis* se fait remarquer par la sécrétion d'une gélatinase très active.

5° L'action des filtrats de culture sur la caséine, ainsi que les transformations qu'elle subit de la part du *Streptothrix de Vallée* en végétation sur le lait, conduisent à envisager l'action de la caséase sur la caséine, comme un phénomène diastasique complexe, comprenant :

a) Une action physique qui solubilise la caséine ;

b) Une action chimique transformant, très probablement par hydro-

lysation, la caséine solubilisée en caséone, substance à réaction de peptone. La solubilisation et la peptonisation de la caséine seraient ainsi, l'œuvre de diastases distinctes ; l'une décoagulante ou liquéfiante ; l'autre peptonisante. Leurs actions seraient plutôt successives que simultanées.

On trouve ici une certaine analogie avec ce qui se passe dans la saccharification de l'amidon par les diastases suivant la théorie de Duclaux. Au cours de cette opération, on admet deux actions : la première due à l'amylase proprement dite, diastase simplement liquéfiante ; la seconde due à la dextrinase ou diastase saccharifiante. Dans ce parallélisme, la présure même, trouve son homologue dans l'amylo-coagulase de Wolf et Fernbach.

6° La puissance gélatinolytique de *Microsporum canis* est particulièrement remarquable, puisque, toutes conditions égales, il suffit d'une *seule goutte* du filtrat de culture pour liquéfier intégralement, en 2 h. 1/2, une masse gélatineuse de 10 c.c. ; tandis que 8 c.c. du même filtrat chauffé 20 minutes au B. M. sont incapables de liquéfier une masse égale de gélatine.

Dans ces conditions d'activité, l'ingérence des microbes n'est plus à redouter, et il devient superflu de filtrer les liquides de culture. Mais pour que les résultats soient toujours comparables, cette opération n'a jamais été négligée. Enfin, grâce à cette activité, j'ai pu faire la mesure du pouvoir gélatinolytique à l'aide de tubes de Mette où l'albumine est remplacée par de la gélatine.

La gélatinase modifie rapidement certaines propriétés physiques de la gélatine, au sein de laquelle elle est introduite, car cette gélatine perd la propriété de se reprendre en gelée par le refroidissement. Plus on s'éloigne de l'instant où s'est effectuée la liquéfaction, et plus la prise en masse est difficile et nécessite de basses températures.

7° L'étude précédente, sans autoriser des affirmations définitives, permet de penser que les trois diastases : caséase, trypsine et gélatinase possèdent chacune leur individualité propre. Il n'y a pas unité d'action, constance et régularité, comme s'il s'agissait d'une seule diastase (protéase), qui pourrait exercer indifféremment et constamment une action digestive sur la caséine, l'albumine et la gélatine.

Les trois diastases ne sont pas toujours étroitement associées ; par suite, elles ne peuvent être identiques, et admettre leur identité serait s'exposer parfois à commettre de graves erreurs ; car de l'existence de l'une d'entre elles on ne saurait conclure à la présence de l'une des deux autres et à plus forte raison des deux autres à la fois.

8° En dehors de ces diastases protéolytiques, les six espèces de champignons parasites désignés, abandonnent dans leurs liquides de culture un ferment soluble agissant comme l'émulsine.

9° Ces mêmes espèces confèrent à leurs liquides de culture la particularité de donner une réaction oxydasique en présence de traces *infinitésimales* de manganèse. Cette réaction s'explique par la présence dans les liquides de culture de principes ammoniacaux volatils, indéterminés, qui comme les alcalis, possèdent la propriété d'activer le pouvoir oxydant du manganèse. Le complexe ainsi formé devient capable comme les oxydases de bleuir la teinture de gaïac et de donner des réactions colorées avec quelques polyphénols.

RÉSUMÉ ET CONCLUSIONS DE LA DEUXIÈME PARTIE.

Dans la deuxième partie de ce travail, je me suis proposé d'étudier les sécrétions toxiques de quelques champignons pathogènes et particulièrement celles de l'*Aspergillus fumigatus*.

1° Des observations de toute nature tendent à établir une barrière entre les affections bactériennes et les affections mycosiques. Le mécanisme infectieux dans chacun des cas a été considéré jusqu'ici comme bien différent : les bactéries agissant par toxines, et les champignons par traumatismes directs ; par action de présence. Peu de champignons pathogènes ont été envisagés comme producteurs de toxine. L'*Aspergillus fumigatus*, agent d'une redoutable mycose a fait l'objet de nombreuses et remarquables recherches sans qu'aucune d'elles ait pu y révéler l'existence certaine d'un principe toxique.

Pourtant, il semble impossible d'expliquer les crises violentes, et le dénouement rapide et brutal de la mycose aspergillaire sans admettre l'intervention d'une sécrétion toxique. Or, cette sécrétion existe.

2° L'**Aspergills fumigatus** produit dans divers milieux de culture une substance toxique. Les effets de ce poison portent sur les centres nerveux et se traduisent plus ou moins rapidement selon le mode d'inoculation, par des symptômes convulsifs, tétaniques et paralytiques entraînant la mort en quelques heures, ou disparaissant sans laisser de traces, suivant les doses injectées.

3° Parmi les espèces animales sensibles à cette toxine se rangent : le lapin et le chien, très sensibles ; le cobaye qui l'est moins ; le chat, la souris, le rat blanc, dont la réceptivité est inférieure à celle du cobaye.

Deux de ces animaux, le chien et le chat présentent cette intéressante particularité d'être naturellement immuns contre les spores de l'*Aspergillus fumigatus* et d'être néanmoins sensibles au poison produit par ce champignon. Le pigeon qui est extrêmement sensible aux spores, offre au contraire une résistance naturelle très grande au poison.

4° La formation de ce poison dans les cultures, pour être abondante exige la réunion en ces milieux d'un aliment azoté, surtout du type des peptones, et d'un hydrate de carbone consommé activement par la plante (glucose, saccharose, maltose, dextrine). Il faut en outre que la réaction soit neutre ou alcaline.

5° La chaleur ne paraît détruire cette substance toxique qu'après un contact de 30 minutes à la température de 120°. Toutefois, le chauffage prolongé à des températures plus basses l'altère et atténue notablement son activité ; il va même jusqu'à la détruire à la température de 90°, quand le temps de chauffe atteint ou dépasse 45 minutes.

6° Ce poison, comme les diastases ou les toxines proprement dites, ne peut-être précipité du liquide, par l'alcool ou être entraîné par un précipité de phosphate de chaux. Il dialyse assez aisément.

7° Ces propriétés semblent éloigner le poison de l'*Aspergillus fumigatus* des toxines bactériennes types qui sont des toxalbumines. Il semble bien probable cependant que le poison intervienne dans la genèse des accidents généraux de la mycose expérimentale ; et, ce fait rigoureusement démontré, établirait une analogie plus étroite entre les mycoses et les maladies bactériennes au point de vue du mécanisme infectieux.

8° Les tentatives d'immunisation à l'aide de ce poison, soit en injectant la toxine non modifiée à doses progressivement croissantes, ou bien la toxine modifiée par la chaleur ou le liquide de Gram ; soit en utilisant le sérum supposé antitoxique, d'un animal inoculé avec des doses faibles de toxine, ont complètement échoué. De plus, les animaux traités par des injections répétées de toxine, sont tout aussi sensibles et quelquefois plus, que des animaux neufs.

9° D'autres champignons pathogènes dont la virulence rappelle celle de l'*Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus orizæ*, *Aspergillus sulphureus*, *Rhizomucor parasiticus*, *Rhizopus equinus*, n'abandonnent pas dans

leurs liquides de culture de produits toxiques, décelables du moins, par les méthodes que j'ai employées pour l'*Aspergillus fumigatus*.

10° La production d'un poison par l'*Aspergillus fumigatus*, dans des conditions bien déterminées, à l'exception de quelques autres Aspergillus non moins pathogènes, pourra s'ajouter aux caractères de l'espèce et intervenir utilement dans la différenciation parfois difficile des espèces aspergilliennes pathogènes.

INDEX BIBLIOGRAPHIQUE

1890. ARTHUS et PAGÈS. — Recherches sur l'action du lab et la coagulation du lait. — Arch. de physiol. t. II, p. 331.

1890. ARTHUS et PAGÈS. — Recherches sur le lab-ferment de la digestion du lait. — Arch. de physiol. t. II. p. 450.

1896. ARTHUS. — Nature des Enzymes. — Thèse de Paris.

1881. ATKINSON. — The Chemistry of saké. — Brening (Univ. de Tokio).

1882. ATKINSON. — Sur la diastase du Koji. — Moniteur scientifique.

1903. AUCLAIR. — Recherches sur les poisons microbiens. — Arch. de médec. expér. p. 725.

1903. BARTHELAT. — Les mucorinées pathogènes et les mucormycoses chez l'homme et chez les animaux. — Thèse médec. Paris.

1864. BÉCHAMP. — Sur les nouveaux ferments solubles. — C. R. Acad. des Sc. t. LIX. p. 495.

1890. BEHRING et KITASATO. — Deutsche medicin. Wochenschr. p.p. 1145-1245

1901. BEHRING et KITASHIMA. — Berliner Klin. Wochedschr. p. 157.

BEHRING. — Allgemeine Therapie der Infections Krankeiten, p. 1052,

1860. BERTHELOT. — Sur la fermentation glucosique du sucre de canne, C. R. Acad. d. Sc. t. L. p. 980.

1895. G. BERTRAND. — Sur la recherche et la présence de la laccase dans les végétaux. C. R. Acad. d. Sc. t. CXX, p. 266. et t. CXXI. p. 166.

1897. G. BERTRAND. — Le manganèse dans la laccase. Ann. agron. t. XXIII, p. 185.

1897. G. BERTRAND. — Sur l'action oxydante des sels manganeux et sur la constitution chimique des oxydases. C. R. Acad. d. Sc. t. CXXIV, p. 1355.

1905. G. BERTRAND. — Le domaine actuel de la chimie biologique. Revue générale des sciences, 30 mai.

1896. BLANCHARD. — Les parasites végétaux. Traité de pathologie générale du professeur Bouchard. t. II. p. 811.

1901. BODIN. Les champignons parasites. — Paris, Masson.

1896. BODIN. — Les teignes tondantes du cheval et leurs inoculations humaines. Thèse méd. Paris.

1905. BODIN. — Les conditions de l'infection microbienne et l'immunité. Paris. Masson.

1897. BODIN et ALMY. — Le *Microsporum* du chien. — Recueil de médecine vétérinaire : 8e série. t. IV.

1901. BODIN et LENORMAND. — Sur la production de caséase par un streptothrix parasite. t. XV. p. 285.

1904. Bodin et Savouré. — Recherches expérimentales sur les mycoses internes. Arch. de parasit. t. viii. p 110.

1899. Boidin. – Bull. de l'Assoc. des chimistes de sucrerie et de distillerie.

1903. Boidin. — Contribution à l'étude de l'amylo-coagulase. C. R. Ac. des Sc. t. cxxxvii. p. 1080.

1896. Bourquelot. — Les ferments solubles. Paris.

1893. Bourquelot. — Les ferments solubles de l'*Aspergillus niger*. Bull. Soc. mycol. de France. t. ix. p. 232.

1893. Bourquelot. — Remarques sur les ferments solubles sécrétés par l'*Aspergillus niger*. C. R. Soc. Biologie. ix. t. v. p. 651.

1893. Bourquelot. — Transformations du tréhalose en glucose par un ferment soluble la tréhalase. Bull. Soc. myc. Fr. t. ix. p. 189.

1896. Bourquelot. — Sur l'hydrolyse du raffinose par les ferments solubles. Journal de phys. et chim. 6e série. t. iii. p. 390.

1898. Bourquelot. — Sur la physiologie du gentianose. Son dédoublement par les ferments solubles. Journal de phys. et chim. 6e série. t. vii. p. 369.

1895. Bourquelot et Hérissey. — Note concernant l'action de l'émulsine de l'*Aspergillus niger* sur quelques glucosides. C. R. Société de Biol. 20 juillet.

1896. Bourquelot et Hérissey. — Sur l'hydrolyse du mélézitose par les ferments solubles. Journal de phys. et chim. 6e série. t. iv.

1899. Bourquelot et Hérissey. — Sur la présence d'un ferment soluble protéolytique dans les champignons. Bull. Soc. mycol. de France. t. xv. p. 60.

1892. Bourquelot et Graziani. — Sur quelques points relatifs à la physiologie du *Penicillium Duclauxii*. Bull. Soc. myc. de France. t. viii. p. 147.

1896. Boullanger. — Contribution à l'étude de quelques levures de bière. Ann. de l'Inst. Pasteur. t. x. p. 598.

1887. Brieger. — Microbes, ptomaïnes et maladies, traduction par Roussy et Winter. Paris.

1892. Calmette. — Contribution à l'étude des ferments de l'amidon. La levure chinoise. — Ann. de l'Inst. Pasteur, p. 604, 620.

1903. Ceni et Besta. — Ueber die Toxine von *Aspergillus fumigatus* und *Aspergillus flavescens* und deren Beziehungen zur Pellagra. - Centrabblatt für allg. Path. und path. Anatomie. t. xiii. n° 23-27 décembre, p. 930, 941.

1905. Ceni et Besta. — Die pathogenen Eigenschaften des *Asper. niger* mit Bezùg auf die Geneses der Pellegra. Zieglers Beitrag z. pat. Anat. ù. z. allg. Path. t. xxxvii, f. 3. p. 578.

1895. Charrin et Ostrowsky. — L'*Oïdium albicans* agent pathogène général. C. R. Acad. de Sc. p. 1234. t. cxx.

1900. Concetti. — Biologie et pathologie du muguet. Archive des maladies des enfants.

1888. Costantin. — Les Mucédinées simples. Paris.

1900. COSTANTIN et LUCET. — *Rhizomucor parasiticus* espèce pathogène de l'homme. Rev. génér. de Bot. XII. p. 81.

1903. COSTANTIN et LUCET. — Sur un *Rhizopus* pathogène. Bull. Soc. mycol. de France, XIX, 3, p. 200.

1895. DÉLÉARDE. — Contributions à l'étude de l'actimonycose. Thèse méd. Lille, 30 nov.

1902. DELEZENNE. — Les kinases microbiennes. C. R. Ac. de Sc. t. CXXXV. p. 252.

1902. DELEZENNE. — Sur l'existence d'une kinase dans le venin des serpents. C. R. Ac. de Sc. t. CXXXV. p. 328.

1903. DELEZENNE et MOUTON. — Sur la présence d'une kinase dans quelques champignons Basidiomycètes. C. R. Ac. de Sc. t CXXXVI. p. 636.

1903. DELEZENNE et MOUTON. — Sur la présence d'une érepsine dans les champignons Basidiomycètes. C. R. Sc. de Biol t. LV, p. 327.

1880-83-84. DUCLAUX. — Mémoires sur le lait. Ann. Inst. agron.

1892. DUCLAUX. — Principes de laiterie. Paris.

1894. DUCLAUX. — Le lait. Paris. Bailliere.

1833. DUCLAUX. — Chimie biologique in Frémy encyclopédie. t IX. 1re sect. Paris.

1899. DUCLAUX. — Traité de microbiologie. t. II, Paris.

1899. EFFRONT. — Les enzymes et leurs applications. Paris. Gauthier-Villars.

1901. FERNBACH. — Sur la tannase. C. R. Ac. des Sc. t. CXXXI. p. 1214.

1890. FRÄNKEL. — Berliner Klinischer Wochenschrif. n° 48.

1903. GARNIER. — Lipase dans *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus flavus*, *Aspergillus glaucus*. C. R. Sc. Biol. 12 déc.

1903. GARNIER. — Lipase dans *St. nigra*, *St. nidulans*, *St. versicolor*. C. R. Soc. Biol. 28 nov.

1896. A. GAUTIER. – Les toxines microbiennes et animales. Paris.

1878. GAYON. — Sur l'inversion et la fermentation alcoolique du sucre de canne par les moisissures C. R. Ac. des Sc. t. LXXXVI. p. 52.

1887. GAYON et DUBOURG. — De la fermentation de la dextrine et de la dextrine et de l'amidon par les mucorées. Ann. de l'Inst. Pasteur. t. V.

1902. GEDŒLST. — Les champignons parasites. Lamertin. Bruxelles.

1893. GÉRARD. — Présence dans le *Penicillium glaucum* d'un ferment agissant comme l'émulsine. C. R. Soc de Biol. IX. t. V. p. 651.

1897. GERARD. — Sur une lipase végétale extraite du *Penicillium glaucum*. Journal de physique et chimie. 6e série. t. V. p. 529.

1894. H. GRASSET. — Etudes sur le Muget. Thèse de Paris.

1898. GÉRET et HAHN. — Zum Nachweiss, des im Helepressast enthaltenen proteolytischen Ensyms (Ber. d.d. ch. Gesell., XXI p. 202 et XXXI, p. 2335).

1904. GUÉGUEN. — Les champignons parasites de l'homme et des animaux Joanin. Paris.

1900 HARLAY. – De l'application de la tyrosinase, ferment oxydant du *Russula delica* à l'étude des ferments protéolytiques. Thèse pharmacie.

1903 Henri et Larguier des Bancels. — Loi d'action de la trypsine sur la gélatine. Etude de la digestion de la caséine par la méthode de conductibilité électrique. C. R. Soc. de Biol. t. LV. p. 866.

1903. Javillier. — Contribution à l'étude de la présure chez les végétaux. Joanin. Paris.

1894. Kotliar. — Contribution à l'étude de la pseudo-tuberculose aspergillaire. Ann. de l'Inst. Pasteur. t. VIII. p. 479.

1904. Labbé. — Du rôle des microorganismes dans les phénomènes de digestion observés chez le *Drosera rotundifolia*. Laval. Goupil.

1896. Laborde. — Recherches physiologiques sur une moisissure nouvelle. Thèse de Paris.

1902. Launoy. — Sur l'action protéolytique des venins. C. R. Ac. des Sc. t. CXXXV. p. 401. 403.

1896. Lucet. — Etude expérimentale et clinique sur l'*Aspergillus fumigatus*. Bull. Soc. cent. de méd. véter. p. 585.

1903. Macé. — Etude sur les mycoses expérimentales. Thèse de Paris.

1900. Malfitano. — La protéolyse chez l'*Aspergillus niger*. Ann. de l'Inst. Pasteur. t. XIV. p. 60.

1900. Malfitano. — Sur la protéase de l'*Aspergillus niger*. Ann. de l'Inst. Pasteur. t. XIV. p. 420.

1903. Malfitano. — Sur la dissociation du pouvoir albuminolytique et du pouvoir gélatinolytique de la protéase charbonneuse. C. R. Sté. de Biol. t. LX. p. 843. 845.

1905. Marchadier. - Contribution à l'étude des ferments solubles oxydants indirects. Thèse doct. pharm. Paris.

1892. Matruchot. — Recherches sur le développement de quelques Mucédinées. Thèse Sc. nat. Paris.

1899. Matruchot et Dassonville. — Sur le champignon de l'herpès (Trichophyton) et les formes voisines et sur la classification des Ascomycètes. Bull. Soc. myc. de Fr. t. XV. p. 420.

1899. Matruchot et Dassonville. — Sur la position systématique des Trichophyton et des formes voisines dans la classification des champignons. C. R. Ac. des Sc. t. CXXVIII. p. 1441.

1899. Matruchot et Dassonville. — Sur les affinités des *Microsporum*. C. R. Ac. des Sc. t. CXXXIX. p. 123.

1899. Matruchot et Dassonville. — Sur le *Ctenomyces serratus*. Eidam, comparé aux champigons des teignes. Bull. Soc. myc. de France. t. XV. p. 305.

1900. Matruchot et Dassonville. — Sur une forme de reproduction d'ordre élevé chez les Trichophyton. Bull. Soc. myc. de Fr. t. XVI. p. 201.

1901. Matruchot et Dassonville. — *Eidamella spinosa*, dermatophyte produisant des périthèces. Bull. Sté. myc. de France. t. XVII. p. 123, 132.

1901. Metchnikoff. — L'immunité dans les maladies infectieuses. Masson. Paris.

1902. Neisser. — Archiv. für dermat. und syph. vol. LX. fasc. 1.

1906. Née. — Etat actuel de la question du favus humain. Asselin et Houzeau.

1898. Obici. — Ueber die pathogenen Eigenschaften des *Aspergillus fumigatus*. Beitrag zür pat. ü. zür. all. Pat. XXIII. p. 197.

1896. Östrowsky. — Les infections bactériennes. Recherches sur l'oïdiomycose. Thèse. Paris.

1906. Paladino-Blandini. — Tossici di ifomiceti. Archivio di Farmacologia sperimentale e scienze affini. Anno v. vol. v.

1880. Pasteur. — Sur les maladies virulentes et en particulier sur la maladie appelée choléra des poules. C. R. Ac. d. Sc. t. xc. p.p. 239. 952, 1030.

1876. Panum. — Ann. de chimie et de phys. 5ᵉ série, t. ix. p 350.

1902. Pinard. — Ferments solubles sécrétés par l'*Aspergillus repens* et l'*Aspergillus clavatus*. Thèse pharmacie. Bordeaux.

1907. Poncet, Lacome et Thévenot. — Recherches sur la toxicité des cultures d'Actinomyces et la présence de leurs produits solubles. Comm. à l'Ac. de méd. 16 avril.

1895. Rénon. — Essais d'immunisation contre la tuberculose aspergillaire. C. R. Sc. de Biologie. 20 juillet.

1897. Rénon. — Etude sur l'Aspergillose chez l'homme et chez les animaux. Masson, Paris.

1853. Robin. — Histoire naturelle des végétaux parasites. p. 515.

1902. Roger. — Les maladies infectieuses. Masson. Paris.

1895. Roussy. — Nouvelles recherches sur la pyrotégénine. L'action des agents physiques sur les propriétés pyrétogènes et diastasiques de l'invertine. C. R. Soc. Biologie. 30 mars. 27 avril.

1888-89-90. Roux et Yersin. — Contribution à l'étude de la diphtérie. Ann. de l'Inst. Pasteur. p. 629, 661. t. ii ; p. 273, 288, t. iii ; p. 384, t. iv.

1905. Savouré. — Recherches sur les mycoses internes et leurs parasites. de Rudeval, Paris.

1903. Trillat. — Influences activantes ou paralysantes agissant sur le manganèse envisagé comme ferment métallique. C. R. Ac. des Sc. t. cxxxvii. p. 922, 925.

1906. Trillat et Sauton. — Le dosage de la matière albuminoïde du lait, Etude d'un nouveau procédé. Ann. Inst. Pasteur. t. xx, p. 991.

1904. Truffi. — Clinica medica italiana. Juin, p. 377.

1892. Vaillard. — Sur l'emploi du sérum des animaux immunisés contre le tétanos. C. R. Ac. des Sc. t. cxx, p. 1181.

1867. Van Tieghem. — Recherches pour servir à l'histoire physiologique des mucédinées. Ann. Sc. nat. bot. t. viii, p. 210.

1891. Van Tieghem. — Traité de Botanique.

1907. Verliac. — Recherches expérimentales sur les toxines de l'Actinomyces. Thèse. Paris, 14 fév.

1856. Virchow. — Beitrage zur Lehre von den beim Menschen vorkommenden pflanzlichen Parasiten (Virchow's Arch. ix, 557).

1903. Wolf et Fernbach. — Sur la coagulation de l'amidon. C. R. Ac. des Sc , 2 nov. t. cxxxvii.

1886. Ziegenhorn. — Versuche über Abschwächung pathogener Schimmelpilze. Arch. f. experim. Path. ü. Pharm. xxi, p. 249.

TABLE DES MATIÈRES

PREMIÈRE PARTIE

Sécrétions diastasiques

DEUXIEME PARTIE

Sécrétions toxiques

